

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE NANTES

ANNÉE 1968-1969

N°

Première Thèse :

**Contribution à l'Etude
des Applications de la Fluorescence X
en Toxicologie**

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 1^{er} février 1969

par

Marie-Françoise GUILLON

née le 9 novembre 1939 à CHEMILLÉ (Maine et Loire)

Pharmacien

Licenciée-es-Sciences

Assistant à la Faculté

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur R. MONNET, Président

Monsieur le Professeur R. GUIHARD, Juge

Monsieur le Professeur H. BOITEAU, Juge

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE NANTES

ANNÉE 1968-1969

N°

Première Thèse :

**Contribution à l'Etude
des Applications de la Fluorescence X
en Toxicologie**

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

THÈSE

POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 1^{er} février 1969

par

Marie-Françoise GUILLON

née le 9 novembre 1939 à CHEMILLÉ (Maine et Loire)

Pharmacien

Licenciée-es-Sciences

Assistant à la Faculté

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur R. MONNET, Président

Monsieur le Professeur R. GUIHARD, Juge

Monsieur le Professeur H. BOITEAU, Juge

UNIVERSITÉ DE NANTES

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE NANTES

N°

Année 1968-1969

Première Thèse :

Contribution à l'étude
des Applications de la Fluorescence X
en Toxicologie

Deuxième Thèse :

Propositions données par la Faculté

THÈSE



POUR L'OBTENTION DU GRADE DE
DOCTEUR D'ÉTAT EN PHARMACIE

présentée et soutenue publiquement

le 1^{er} février 1969

par

Marie-Françoise GUILLOU

née le 9 novembre 1939 à CHENAILLE (Maine et Loire)

Pharmacien

licenciée en Sciences

inscrit à la Faculté

MEMBRES DU JURY :

Monsieur le Professeur R. MONNET, Président
Monsieur le Professeur R. GUIHARD, Juge
Monsieur le Professeur H. BOITEAU, Juge

FACULTE MIXTE DE MEDECINE
ET DE PHARMACIE
DE NANTES

Doyens honoraires de la Faculté :

MM. AUVIGNE, BOQUIEN

Professeurs honoraires de l'Ecole de Plein Exercice,
de l'Ecole Nationale
et de la Faculté :

MM. DALLONGEVILLE, GIROIRE, GUERITHAULT,
GUEGUEN, LEROUX, PERRIN, PICARD

Doyen : M. J.P. KERNEIS

Assesseurs: MM.A.FOUCAUD, E.CORNET

PROFESSEURS TITULAIRES DE CHAIRE

MM.

F. BARON	O.R.L.
S. BERNARD	Biochimie médicale
Y. BOQUIEN	Clinique médicale B
R. BUREAU	Clinique chirurgicale infantile et Orthopédique
Y. BUREAU	Clinique dermatologique
J. DELAIRE	Clinique stomatologique
E. CORNET	Clinique chirurgie thoracique et cardio- vasculaire
P. DESCUNS	Clinique neuro-chirurgicale
L. DUMORTIER	Médecine sociale et Médecine du Travail
A. FOUCAUD	Botanique et Cryptogamie
J. GRISLAIN	Clinique médicale infantile
R. GUIHARD	Physique
J. GUILLON	Pathologie médicale
J. HOREAU	Clinique médicale A

P. HOULNE	Clinique obstétricale
J.P. KERNEIS	Anatomie pathologique
J. LEGRAND	Clinique ophtalmologique
E.P. LOSSOUARN	Chimie pharmaceutique
P. MALVY	Pathologie chirurgicale
R. MONNET	Matière médicale et Pharmacologie
M. MOUSSEAU	Clinique chirurgicale
M. NEDELEC	Clinique urologique
J. PLOQUIN	Pharmacie chimique
M. ROUZET	Pharmacie galénique
J. SOURDILLE	Clinique traumatologique
Y. STEPHAN	Pharmacodynamie et Chimie Biologique
	Pharmaceutique
J. TUSQUES	Histologie et Embryologie
P. VERAN	Thérapeutique
C. VERMEIL	Parasitologie et Pathologie exotique
F. VIOLETTE	Physiologie

PROFESSEURS TITULAIRES A TITRE PERSONNEL

MM.

F. GILLOT	Pédiatrie
P. MINICONI	Médecine générale

Mme MUSSINI-
MONTPELLIER

Anatomie Pathologique

PROFESSEURS SANS CHAIRE

MM.

J. BARBIN	Anatomie
H. BARRIERE	Dermatologie
H. BOITEAU	Toxicologie
J. GOUIN	Orthopédie
D. GUIHARD	Physique
F. HERVOUET	Ophtalmologie
E. PICHAT	Anatomie

PROFESSEUR ASSOCIE

M.

D. DILENGE	Neuro-Radiologie
------------	------------------

MAITRES DE CONFERENCES-AGREGES

MM.

L. BODIC (f.f.)	Médecine générale
A. CATTAN	Cancérologie
A. CHARBONNEL	Neurologie
M. COLLET	Neuro-Chirurgie
J. CORROLLER	Pneumo-Phtisiologie
S. COTTIN	Médecine générale et Thérapeutique
A. COURTIEUX	Bactériologie
H. DUPON	Chirurgie thoracique et Cardiovasculaire
A. GAILLARD	Stomatologie
P. GALLE	Physique Biologique
J.D. GINET	Physiologie
J. GUENEL	Médecine générale
D. HERVOUET	Médecine générale
Mme A.M. HERZOG (f.f.)	Electroradiologie
B. HERZOG	Electroradiologie
G. LEFRANC (f.f.)	Histologie et Embryologie
F. LEGENT (f.f.)	O. R. L.
M. LERAT	Obstétrique
Y. MADEC (f.f.)	Biochimie médicale
R. MAINARD	Clinique médicale infantile
Ch. MOIGNETEAU	Pneumo-Phtisiologie
Mme F. NICOLAS	Anesthésiologie
G. NICOLAS	Médecine légale
P. OUDEA	Médecine générale et Thérapeutique
Mme Y. DE ROECK	Pharmacie galénique
Ch. ROUSSEAU (f.f.)	Sciences Naturelles
J. TARDIVEAU	Electroradiologie
P. VERCELLETTO (f.f.)	Neurologie
L. WELIN	Pharmacodynamie

AGREGES EN EXERCICE

MM.

J. AUVIGNE	Urologie
A. SILVESTRE DE FERRON	Chirurgie générale

Secrétaire de la Faculté E. BOULESTEIX

Conservateur de la Bibliothèque
de l'Université

Mme GALKOWSKI

A mes parents ✓

A mon fiancé

A ma famille

A mes amis

En témoignage de mon affection.

A Monsieur le Professeur R. M O N N E T

Professeur de Matière Médicale et Pharmacologie

qui nous fait l'honneur d'accepter la
présidence de notre jury.

Vous avez toujours porté à cette étude
un intérêt bienveillant et vous nous
avez souvent prodigué des encouragements
au cours de ce travail.

Nous vous prions de trouver ici le té-
moignage de notre profonde et respec-
tueuse reconnaissance.

A Monsieur le Professeur R. G U I H A R D

Professeur de Physique

qui nous fait l'honneur de juger notre thèse.

Nous vous remercions pour l'extrême amabilité que vous nous avez toujours témoignée et nous vous assurons de notre profonde reconnaissance.

A Monsieur le Professeur H. B O I T E A U

Professeur sans Chaire (Toxicologie)

qui nous fait l'honneur de bien vouloir juger notre thèse après en avoir inspiré le sujet.

Vous avez été pour nous un guide éclairé et sûr pendant ces quatre années et vous nous avez formée aux sévères disciplines du laboratoire, nous apportant votre aide et votre expérience avec une constante bienveillance.

Nous vous prions de bien vouloir accepter l'expression de notre très vive et profonde reconnaissance et l'assurance de notre très respectueux attachement.

A Monsieur le Professeur A. F O U C A U D

Premier Assesseur du Doyen

Professeur de Botanique

Nous le remercions pour son enseignement et pour sa constante bienveillance à notre égard. Qu'il veuille bien trouver ici l'expression de notre sincère reconnaissance.

A Monsieur le Professeur L. W E L I N

Professeur agrégé de Pharmacodynamie

Nous lui exprimons notre reconnaissance pour les conseils qu'il nous a prodigués lors de la rédaction de notre deuxième thèse.

A Messieurs les Professeurs de la Faculté

en témoignage de notre reconnaissance.

A Monsieur C. M O U S S I O N

Chef de Travaux Pratiques au laboratoire de Toxicologie

en témoignage d'amitié et avec nos
remerciements pour sa collaboration
à nos travaux.

A Madame L E R A Y

dont l'aide efficace nous a été
précieuse.

Qu'elle trouve ici nos remerciements.

A Mademoiselle C H E V A L I E R et
Mademoiselle B O U S S I C A U L T

Nous les remercions de leur
collaboration amicale.

Nous adressons nos sincères remerciements à la COMPAGNIE GENERALE DE RADIOLOGIE pour la collaboration technique qu'elle a bien voulu apporter à la réalisation de notre travail.

Les dispositifs spéciaux que nous avons utilisés ont été réalisés dans les Ateliers de Mécanique de la Société SUD - AVIATION de BOUGUENAIS à laquelle nous exprimons notre vive reconnaissance.

Par délibération en date du 7 mars 1962,
la Faculté a arrêté que les opinions émises dans les
dissertations qui lui seront présentées doivent être
considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle
n'entend leur donner aucune approbation, ni improba-
tion.

P R E M I E R E P A R T I E

G E N E R A L I T E S

I - L'analyse par spectrométrie

de fluorescence X

1 - Principe

D'après la théorie de KOSSEL, le départ d'un électron gravitant sur une orbite interne d'un atome crée un état instable, dit d'activation. Sous l'influence de l'attraction exercée par le noyau, un électron d'une autre orbite plus externe viendra prendre la place de l'électron manquant (figure n°1).

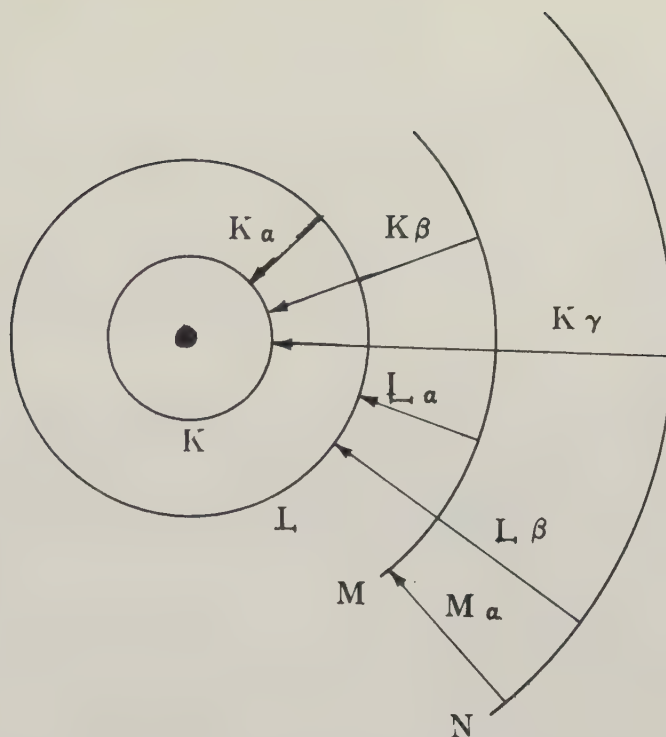


Figure n°1 - Schéma de KOSSEL

Le saut de cet électron d'un niveau d'énergie W_m à un niveau inférieur W_n donne lieu à l'émission d'un rayonnement électromagnétique de fréquence ν telle que :

$$W_m - W_n = h\nu$$

h représentant la constante de PLANCK.

Si un électron de la couche K vient à manquer, il peut être remplacé par un électron provenant, soit de couche L (émission de la raie $K\alpha$), soit de la couche M (émission de la raie $K\beta$), soit de la couche N (émission de la raie $K\gamma$). De la même manière, le remplacement d'un électron de la couche L par un électron de la couche M ou N produit l'émission des raies $L\alpha$ ou $L\beta$.

En réalité, le phénomène est plus complexe, par suite de l'existence des niveaux secondaires d'énergie. On aura ainsi deux raies $K\alpha$ ($K\alpha_1$ et

$K\alpha_2$) et trois raies $K\beta$ ($K\beta_1$, $K\beta_2$ et $K\beta_3$).

Les électrons d'une couche électronique interne subissent une forte attraction de la part du noyau. L'expulsion de l'un d'eux nécessite une grande énergie qui peut être fournie, soit par des électrons accélérés sous des tensions élevées de l'ordre de 50 kV, soit par des photons X très énergétiques émis par une anticathode soumise à un flux d'électrons. Dans le premier cas, il s'agit d'un rayonnement d'émission directe, dans le second d'un rayonnement secondaire dit de fluorescence X.

Tous les éléments émettent des spectres de fluorescence X et chaque spectre est caractéristique de l'élément qui le produit. Les spectres de fluorescence X sont relativement simples et faciles à interpréter, car ils ne comportent qu'un petit nombre de raies. Les fréquences ν de ces raies sont liées au nombre atomique (Z) des éléments par la relation de MOSELEY :

$$\sqrt{\nu} = A (Z - \alpha n)$$

dans laquelle A représente une constante et αn le coefficient d'écran.

Les spectres de fluorescence X s'étendent sur une zone de longueurs d'onde qui va de 0,10 Å environ pour les raies $K\alpha$ de l'uranium à 980 Å pour la raie $K\alpha$ de l'hydrogène. Cette valeur a dû être calculée par extrapolation, car, si tous les éléments peuvent émettre des spectres de fluorescence X, ces derniers ne sont pas tous décelables, en raison des phénomènes d'absorption et des difficultés de détection qui limitent les possibilités de mesure des rayonnements. A l'heure actuelle, malgré l'ampleur des progrès techniques réalisés dans ce domaine, les seuls éléments dont les spectres de fluorescence soient décelables, sont ceux dont le numéro atomique est supérieur à 11 (sodium). La plupart des éléments toxiques peuvent donc être caractérisés et dosés par spectrométrie de fluorescence X à l'exception de trois d'entre eux dont les nombres atomiques sont inférieurs à 11 : le beryllium (Z = 4), le bore (Z = 5) et le fluor (Z = 9).

L'identification des éléments contenus dans un échantillon peut être effectuée par repérage de la position des raies de leurs spectres sur l'échelle des longueurs d'onde et leur dosage par la mesure de l'intensité d'une raie convenablement choisie. En effet, dans des conditions d'excitation et de mesure identiques, l'intensité du rayonnement de fluorescence X est proportionnelle à la quantité d'éléments exposée au faisceau de radiations excitatrices.

Pour effectuer le dosage, il suffit donc de comparer la valeur de

l'intensité mesurée avec des valeurs de référence obtenues dans des conditions identiques, à partir d'échantillons contenant des quantités connues de l'élément à doser.

2 - Appareillage

En général, les spectromètres utilisés pour les mesures de diffraction aux rayons X peuvent également servir aux mesures de fluorescence.

Dans ces appareils, on retrouve les éléments classiques :

a - la source de radiations excitatrices, constituée par un tube à rayons X émettant un faisceau qui arrive sur l'échantillon avec un angle d'incidence voisin de 45 °. Le choix de l'anticathode est fixé en fonction de l'élément à examiner. Le plus souvent, on utilise en fluorescence X, des anticathodes de tungstène, de molybdène, de cobalt, d'or, de cuivre, de chrome, de nickel et de fer. Dans la plupart des appareils, on peut d'ailleurs effectuer aisément la commutation des diverses anticathodes.

b - le porte-échantillon, dont la structure et la forme varient suivant la nature de l'échantillon à examiner, lequel peut être liquide ou solide (sous la forme d'une éprouvette métallique ou bien d'une pastille de poudre comprimée).

c - le monochromateur, qui analyse le rayonnement de fluorescence X polychromatique. Le système dispersif est constitué d'un monocristal choisi de telle manière que la distance interréticulaire (d) soit comprise entre 2 et 10 Å. Le réseau cristallin diffracte les rayons X dans les conditions définies par la loi de BRAGG : un rayonnement de longueur d'onde (λ) qui arrive sur la surface d'un cristal sous un angle (θ), est réfléchi, selon un angle égal à l'angle d'incidence, lorsque :

$$2 d \sin \theta = n \lambda$$

n représentant l'ordre de réflexion.

La mesure de la direction de réflexion, égale à 2θ , permet de cal-

culer la longueur d'onde du rayonnement X. Des tables indiquent la correspondance entre la valeur de l'angle 2θ et cette longueur d'onde pour chacun des cristaux qui peuvent être utilisés. Ces derniers sont choisis en fonction de leur distance interréticulaire. Parmi les plus couramment employés figurent : le fluorure de lithium, le quartz, le chlorure de sodium, le topaze, le gypse, le diphosphate d'ammonium et le tartrate d'éthylènediamine.

Les cristaux analyseurs peuvent être plans ou courbes. La forme courbe permet une focalisation du rayonnement de fluorescence X sur la fenêtre du détecteur, condition favorable à l'analyse des petits échantillons et à l'amélioration du pouvoir séparateur.

d - le goniomètre solidaire du monochromateur et du détecteur. Le dispositif est conçu de telle manière que le détecteur tourne d'un angle 2θ , lorsque le monochromateur tourne d'un angle θ .

La position du dispositif est repérée sur un tambour gradué en centièmes de degrés. Le réglage du goniomètre sur une position déterminée se fait à la main. Mais il est également possible de commander le déplacement du goniomètre par un mécanisme automatique, lorsque l'on désire explorer une région du spectre d'une manière continue, avec une vitesse angulaire déterminée.

e - le détecteur, qui sert à mesurer l'intensité du rayonnement de fluorescence X à la sortie du monochromateur. Les compteurs de GEIGER et les compteurs proportionnels ne sont plus guère utilisés. A l'heure actuelle, deux types de compteur permettent de couvrir pratiquement l'ensemble des spectres X des éléments : le compteur à scintillation pour les éléments lourds et le compteur à flux gazeux indispensable pour les éléments légers.

f - le système de comptage dénombre les impulsions reçues par le détecteur.

Les appareils sont également équipés d'un enregistreur graphique qui permet l'exploration continue d'une région du spectre. Selon le mode de détermination désiré, les impulsions reçues par le détecteur peuvent être dirigées à volonté vers le circuit de comptage ou vers le dispositif d'enregistrement.

Les mesures de fluorescence X peuvent s'effectuer dans une zone comprise entre 0,3 et 10 Å. Jusqu'à 2 Å (baryum et chrome), le rayonnement X n'est pas absorbé par les gaz de l'air, au-delà de cette valeur, l'absorp-

tion par l'air devient gênante et impose de placer le cristal et les collimateurs dans le vide ou sous atmosphère d'hélium. Pour les longueurs d'onde supérieures à 3 Å (titane), il est indispensable d'opérer en dehors de toute atmosphère gazeuse. L'ensemble représenté par l'échantillon, les collimateurs, le cristal et le détecteur doit alors se trouver sous un vide inférieur à 1 m/m de Hg.

II - Applications de l'analyse
par spectrométrie de fluorescence X
en Biologie et en Toxicologie

Préconisée par von HEVESY, en 1932, l'analyse par spectrométrie de fluorescence X n'a reçu ses premières applications pratiques qu'en 1950, à l'époque où les constructeurs ont commencé à produire des spectrographes équipés de sources à grande puissance d'excitation et de compteurs dotés d'une haute sensibilité.

La spectrométrie de fluorescence X est donc une méthode analytique récente. Mais, en raison de ses avantages, elle a vite suscité un grand intérêt dans de nombreux domaines, notamment la métallurgie, la géochimie et l'industrie des pétroles, où, après un rapide essor, elle est devenue une méthode d'utilisation courante.

Ses premières applications à l'analyse des milieux biologiques sont apparues vers 1959, lorsque NATELSON et ses collaborateurs (42) (43) (44) ont proposé une méthode qui permet de doser le chlore, le soufre, le phosphore, le calcium et le potassium dans le sérum sanguin, en mesurant la fluorescence X de ces éléments sur le résidu d'évaporation d'une goutte de sérum déposée sur un disque de papier filtre. Quelques temps plus tard, les mêmes auteurs ont étendu leur méthode au dosage du fer dans le sang total (45).

NATELSON et SHEID ont également mis au point un procédé de dosage du strontium dans les os et dans le sang par spectrométrie de fluorescence X (46).

En 1961, HALL (32) a publié une méthode de dosage du zinc dans la prostate, il mesure directement la fluorescence X de cet élément sur des biopsies de tissu prostatique préalablement desséchées.

En 1962, ALEXANDER (12) a décrit une méthode qui permet de doser le zinc, le cuivre et le fer dans les cendres de milieux biologiques. Plus récemment, en 1964, il a proposé de doser le chlore, le phosphore, le soufre, le calcium et le potassium dans les poudres obtenues par broyage de fragments d'organes lyophilisés (13).

Dans le domaine de la Biologie, il faut également citer les travaux de CHAMPION et de ses collaborateurs, en 1966 (21) sur le dosage du strontium dans divers produits d'origine végétale (herbes, aiguilles de pin, paille, trèfle) ou d'origine animale (lait en poudre).

L'introduction de la spectrométrie de fluorescence X en Toxicologie date de 1960. Ce sont KAWASHIRO et TANABE (38) qui semblent avoir été les premiers à l'utiliser pour doser des éléments toxiques dans un milieu biologique, en l'occurrence le manganèse et le mercure dans des moules.

On peut également considérer comme une application de caractère toxicologique la méthode proposée par JACKWERTH et KLOPPENBURG (37) pour le dosage du zinc, du gallium et de l'indium dans des spots de chromatogrammes sur papier ; sa précision est de l'ordre de 5 p.100 pour des quantités voisines de 5 µg.

L'emploi de la spectrométrie de fluorescence X pour doser des éléments préalablement séparés par chromatographie sur papier ou par électrophorèse a été étendu par WENGER et ses collaborateurs (59) au dosage du plomb, du mercure, du bismuth et du strontium ; la précision des résultats est de l'ordre de 10 p. 100 pour des quantités de métaux comprises entre 10 et 100 µg. A l'issue de leurs travaux, les auteurs concluent que la séparation préalable

par chromatographie ou par électrophorèse est superflue, puisqu'il est possible d'atteindre la même sensibilité et la même précision en mesurant directement les fluorescences X sur le dépôt obtenu en évaporant une solution des quatre cations sur un disque de papier filtre.

Plusieurs procédés ont également été proposés pour doser des toxiques après les avoir isolés à l'état de précipités insolubles ou sous la forme de complexes extractibles par un solvant organique. En 1964, BROOKS et ses collaborateurs (18) ont indiqué la méthode suivante pour le dosage du mercure dans l'urine : après minéralisation par le mélange sulfo-permanganique, le mercure est précipité à l'état de sulfure par action de la thioacétamide à chaud, en milieu acide, en présence de cuivre comme entraîneur ; les sulfures sont isolés par filtration à travers une membrane Millipore, sur laquelle on mesure ensuite la fluorescence X du mercure ; cette méthode permet de doser le mercure dans l'urine à partir de 30µg/litre avec une précision voisine de ± 2 p.100.

En 1967, MARCIE (40) a préconisé une méthode pour doser plusieurs métaux ou métalloïdes toxiques présents dans l'eau à des concentrations inférieures à 0,01 ppm : les éléments sont extraits à l'aide d'une solution chloroformique de dithiocarbamate de pyrrolidine, puis la solution organique est évaporée sur un disque de papier filtre, qui est ensuite analysé par spectrométrie de fluorescence X ; grâce à cette méthode, l'auteur parvient à doser dans l'eau quinze toxiques avec une précision de ± 10 p.100.

Deux auteurs ont étudié la possibilité de doser des métaux toxiques directement dans les milieux biologiques desséchés.

HAUCK (33), en 1964, a proposé de doser le plomb dans le sang en mesurant sa fluorescence X sur des pastilles obtenues par compression de poudre de sang au taux de 0,05 ppm. De leur côté, GOLDMAN et ses collaborateurs (28), en 1966, ont mis au point un procédé de dosage du thallium dans les milieux biologiques qui repose sur un principe analogue : les échantillons de tissus desséchés, puis broyés, fournissent une poudre qui est comprimée dans un support en matière plastique ; sur la pastille ainsi préparée, on mesure la fluorescence de la raie $L\beta_1$ du thallium ; il est possible de déterminer par cette méthode des taux de toxique compris entre 5 et 1 000 ppm avec une erreur absolue de ± 18 ppm.

Enfin, il faut signaler les travaux de SENTENAC-ROUMANOU (53) sur la possibilité de doser l'arsenic et le baryum dans des solutions aqueuses par spectrométrie de fluorescence X. En phase liquide, la sensibilité est faible : les limites de dosage trouvées sont de 75 mg/l pour l'arsenic et 20 g/l pour le baryum.

DEUXIEME PARTIE

BASES THEORIQUES DES RECHERCHES PERSONNELLES

I - Effet de matrice et de tiers -

élément en fluorescence X

Dans le cas le plus général, l'échantillon que l'on se propose d'analyser par spectrométrie de fluorescence X se présente sous la forme d'une pastille, de taille variable, composée d'un mélange plus ou moins complexe de substances minérales ou organiques. Pour qu'elle puisse être placée dans le porte-échantillon du spectromètre, cette pastille doit être fixée sur un support dont la nature est conditionnée par les stades préliminaires de l'analyse.

Le rayonnement X qui part de cet échantillon vers le cristal analyseur est polychromatique ; il comprend les radiations de fluorescence X des éléments de l'échantillon excitable par le rayonnement primaire ainsi que les radiations de fluorescence X émises par le support et des radiations diffusées. L'ensemble des rayonnements qui accompagnent le rayonnement de fluorescence X spécifique de l'élément recherché constituent ce que l'on appelle l'effet de matrice. L'orientation du cristal analyseur et la discrimination électronique du compteur permettent d'atténuer considérablement l'influence de cet effet. Toutefois, même dans les meilleures conditions de réglage, il n'est pas possible de l'éliminer totalement et il subsiste toujours un fond spectral plus ou moins intense, selon la nature de la matrice et la longueur d'onde de la radiation analysée.

En outre, parmi les éléments qui accompagnent l'élément recherché (élément A), il en est certains qui peuvent modifier sa fluorescence X en l'atténuant ou en l'exaltant. Cette action est connue sous le nom d'effet de tiers-élément.

L'intensité de la radiation caractéristique de l'élément A ($I_{\lambda A}$) est liée à sa concentration dans l'échantillon (C_A) par la relation :

$$I_{\lambda A} = \frac{K C_A}{C_A (\mu_A + \mu'_A) + C_B (\mu_B + \mu'_B) + \dots C_N (\mu_N + \mu'_N)}$$

dans laquelle :

- $C_B, \dots, C_N$ représentent les concentrations des divers éléments composant l'échantillon ($\sum_A C = 1$)
- $\mu_A, \mu_B, \dots, \mu_N$, les coefficients massiques d'absorption du rayonnement X d'excitation par les éléments A, B, ... N.
- $\mu'_A, \mu'_B, \dots, \mu'_N$, les coefficients massiques d'absorption de la radiation de fluorescence λ_A par les éléments A, B, ... N.

La présence des éléments étrangers peut donc provoquer l'atténuation de l'intensité du rayonnement $I_{\lambda A}$ de deux manières : par absorption d'une fraction de l'énergie excitatrice ou par absorption d'une fraction de l'énergie d'émission.

Quant à l'excitation de la fluorescence de l'élément A, elle se

produit lorsque les éléments étrangers émettent eux-mêmes des radiations de longueurs d'onde inférieures ou égales à λ_A , donc capables d'exciter l'élément A.

II - Problèmes posés par l'application

de la spectrométrie de fluorescence X

à l'analyse toxicologique

Il ressort des quelques considérations qui précèdent que les meilleures conditions pour mesurer la fluorescence X d'un élément se trouveront réalisées lorsque l'effet de matrice et l'effet de tiers-élément seront aussi faibles que possible. Les conditions idéales seraient de pouvoir effectuer la mesure sur un élément isolé à l'état pur, étalé sur un support dont le fond spectral serait pratiquement négligeable.

L'analyse toxicologique des poussières de l'air, recueillies par aspiration à travers un filtre, peut s'effectuer dans des conditions qui paraissent assez proches de ces conditions idéales. Les éléments à identifier et à doser se trouvent étalés sous la forme d'un dépôt extrêmement mince, dans lequel ils sont certes accompagnés d'éléments étrangers, mais en proportions relativement peu élevées, à moins que la concentration du toxique recherché soit très faible par rapport à celle de l'ensemble des produits qui entrent dans la composition des poussières analysées.

Par contre, l'analyse des milieux biologiques, telle qu'elle se présente en Toxicologie, paraît très éloignée des conditions idéales, puisqu'elle a pour but d'identifier et de doser des quantités infimes de toxiques, qui se trouvent disséminées au sein d'une masse relativement considérable de matières organiques.

Placés devant ce problème, nous avons examiné les diverses solutions qui peuvent être envisagées. La méthode la plus séduisante, car la plus simple et la plus rapide, consiste à mesurer la fluorescence X des éléments recherchés directement sur l'échantillon de tissu biologique préalablement desséché et pulvérisé. Dans ces conditions, les éléments légers (carbone, hydrogène, oxygène et azote), qui sont les constituants fondamentaux du matériel biologique, ne doivent pas constituer un obstacle majeur à la mesure de la fluorescence X des toxiques recherchés : en effet, ils émettent des rayonnements de grandes longueurs d'onde, qui ne sont pas détectables et qui sont incapables d'exciter les éléments plus lourds. Par ailleurs, leurs coefficients massiques d'absorption sont faibles (tableau n° 1), ce qui tend à réduire leurs effets de tiers-élément. Néanmoins, en raison de la disproportion des concentrations en présence, il faut s'attendre à ce qu'ils atténuent quand même d'une manière appréciable l'intensité des radiations de fluorescence X émises par les éléments toxiques recherchés.

Pour augmenter la concentration du toxique dans le milieu analysé, on pourrait envisager une autre méthode, qui consisterait à opérer non plus sur le tissu biologique desséché, mais sur ses cendres, obtenues par calcination à l'air libre, dans le cas de toxiques minéraux non volatils, ou par combustion dans l'oxygène pur, en enceinte close, dans le cas de toxiques volatilisables à des températures peu élevées. Après élimination des matières organiques, le milieu serait environ dix fois plus riche en toxiques, puisque le rapport matières sèches/ cendres est en général de cet ordre de grandeur. Mais nous pensons que cet enrichissement serait illusoire, car le fait de remplacer une matrice constituée en majeure partie de matières organiques par une matrice strictement minérale augmenterait dans une forte proportion l'effet de tiers-élément. L'élément recherché se trouverait dilué dans un milieu constitué de chlorures, de sulfates, de phosphates, de sodium, de potassium et de calcium, sels minéraux dont les éléments ont des coefficients massiques d'absorption beaucoup plus élevés que ceux du carbone, de l'hydrogène, de l'oxygène et de l'azote (tableau n° 1). Analyser les cendres, au lieu du matériel desséché, ne semble donc pas devoir améliorer les conditions de mesure de la fluorescence X, puisqu'il en résulte une augmentation de l'effet de

Eléments	Coefficients massiques d'absorption	Eléments	Coefficients massiques d'absorption	Eléments	Coefficients massiques d'absorption
H	0,43			Na	30,1
C	4,60	P	74,1	K	143
N	7,52	S	89,1	Ca	162
O	11,50	Cl	106,0	Fe	308

TABLEAU n° 1 - Coefficients massiques d'absorption de divers éléments
Raie Cu K α (1,542 Å)

tiers-élément, qui vient compenser l'augmentation de la concentration du toxique dans le milieu analysé.

Cette possibilité d'enrichissement paraissant, à priori, inefficace et même aller à l'encontre du but cherché, nous sommes amenés à envisager l'emploi de méthodes qui reposent sur la séparation de l'élément toxique après minéralisation du milieu organique dans lequel il se trouve. Dans ce cas, il faut que cet élément puisse être isolé sous la forme d'un précipité insoluble dans l'eau, tels certains sulfures, ou d'une combinaison organique extractible par un solvant non miscible à l'eau, comme peuvent en former des chélateurs tels la dithizone ou le dithiocarbamate de pyrrolidine. Il faut ensuite que la forme sous laquelle le toxique a pu être isolé soit susceptible d'être incorporé à un support qui se prête à l'analyse par fluorescence X. De telles méthodes comportent évidemment des manipulations longues et complexes, mais elles ont le mérite d'amener le toxique sous une forme où il n'est accompagné que d'un petit nombre d'éléments étrangers : quelques atomes de soufre dans des sulfures, quelques atomes de carbone, d'azote, d'hydrogène et d'oxygène dans les combinaisons organiques, ce qui a pour conséquence de minimiser considérablement les effets de matrice et de tiers-élément.

Après avoir passé en revue les diverses possibilités qu'offre la spectrométrie de fluorescence X pour résoudre les problèmes posés par l'analyse toxicologique, nous avons dû faire un choix parmi les méthodes envisagées et sélectionner celles dont l'étude paraissait mériter d'être entreprise.

En ce qui concerne l'analyse des poussières prélevées dans l'atmosphère, l'emploi de la spectrométrie de fluorescence X nous a semblé particulièrement intéressant, car il devait conduire à des méthodes simples et rapides. Nous avons donc entrepris l'étude et la mise au point d'un procédé destiné à identifier et à doser les toxiques minéraux dans les poussières recueillies par aspiration de l'air à travers un filtre de qualité et de dimensions convenablement choisies.

Dans le cas de l'analyse toxicologique des milieux biologiques, nous avons limité nos recherches à l'étude de deux méthodes : l'analyse directe des produits desséchés et pulvérisés, et l'analyse après enrichissement par précipitation ou par extraction à l'aide d'un solvant organique.

III - Modes de comptage

Quand il s'agit de fixer le nombre des impulsions qui doivent être comptées pour mesurer l'intensité d'un rayonnement, deux facteurs sont à considérer : l'erreur de comptage et le temps de comptage.

L'écart-type (s_N) du nombre d'impulsions compté (N) étant égal à :

$$s_N = \sqrt{N}$$

l'erreur de comptage est définie par le rapport :

$$\epsilon = \frac{s_N}{N} = \frac{\sqrt{N}}{N} = \frac{1}{\sqrt{N}}$$

ou encore :

$$\epsilon = \frac{1}{\sqrt{R.t}}$$

en désignant par R le taux de comptage, exprimé en impulsions par seconde, et par t le temps de comptage exprimé en secondes, de telle manière que :

$$N = R.t$$

Pour réduire l'erreur de comptage, il y a donc intérêt à compter un grand nombre d'impulsions, ce qui revient, pour une intensité donnée, à prolonger la durée du temps de comptage. Ainsi, pour un taux de comptage de 100 imp./sec., les erreurs seront respectivement de 1,41, 1 et 0,5, quand les temps de comptage passeront de 50 à 100, puis à 400 secondes.

Mais, pour des raisons pratiques, il ne faut pas non plus prolonger exagérément la durée du comptage.

Plusieurs modes de comptage peuvent donc être envisagés :

- compter le nombre des impulsions produites pendant un temps donné (méthode F.T. - "Fixed time").

- mesurer le temps nécessaire pour compter un nombre d'impulsions déterminé (méthode F.C. - "fixed count").

- compter un nombre d'impulsions qui représente un compromis entre

la précision du comptage et sa durée en utilisant une méthode d'optimisation ; ce type de méthode présente de l'intérêt lorsqu'il s'agit d'effectuer un nombre important de déterminations.

Nos recherches ne nécessitant pas de grandes séries de mesures, nous n'étions pas limités par le temps. Nous avons donc employé la méthode F.T., considérée comme plus précise que la méthode F.C., en adoptant, pour la plupart des mesures, un temps de comptage de 100 secondes. Les taux de comptage que nous avons eu à mesurer étant en général compris entre 100 et 1000 imp./sec., ce temps de 100 secondes correspond à des erreurs allant de 1 à 0,3 p.100.

IV - Modes de calcul

des concentrations recherchées

La détermination qualitative ou quantitative, par spectrométrie de fluorescence X, d'un élément présent à une très faible concentration dans un échantillon, consiste à comparer l'intensité d'une raie caractéristique de cet élément mesurée sur l'échantillon avec l'intensité de cette raie mesurée sur un échantillon de référence contenant une quantité connue de l'élément recherché. Dans le cas de très faibles concentrations, la méthode qui repose sur l'enregistrement du spectre de fluorescence X n'est pas utilisable, car sa sensibilité est insuffisante pour que les raies de fluorescence émises par l'élément recherché se détachent du fond spectral d'une manière significative.

En fait, la valeur de la fluorescence totale (R_t) mesurée à un angle θ_x représente la somme de l'intensité de la raie de fluorescence de l'élément (R_x) et de celle émise par le fond, appelée fluorescence de base (R_b) :

$$R_t = R_b + R_x \quad (1)$$

ces intensités étant exprimées en nombre d'impulsions par seconde.

Toute mesure de l'intensité d'une raie caractéristique de l'élément recherché doit donc être corrigée en fonction de la fluorescence de base, toutes les fois que celle-ci ne peut pas être tenue pour négligeable (fig. n° 2).

Deux modes de détermination permettent d'évaluer cette fluorescence :

- il est possible de la mesurer directement sur un échantillon ne différant de celui analysé que par l'absence de l'élément recherché (essai à blanc), à la condition bien entendu qu'un tel échantillon puisse exister.

- on peut encore la calculer par interpolation à partir de deux mesures de fluorescence R_1 et R_2 , effectuées à deux angles θ_1 et θ_2 encadrant θ_x (méthode dite du "fond continu"), selon la relation :

$$R_b = \frac{R_1 + R_2}{2} \quad (2)$$

R_x devient alors :

$$R_x = R_t - \frac{R_1 + R_2}{2} \quad (3)$$

Chacune de ces méthodes présente des avantages et des inconvénients. La mesure directe de la fluorescence de base suppose que la valeur trouvée

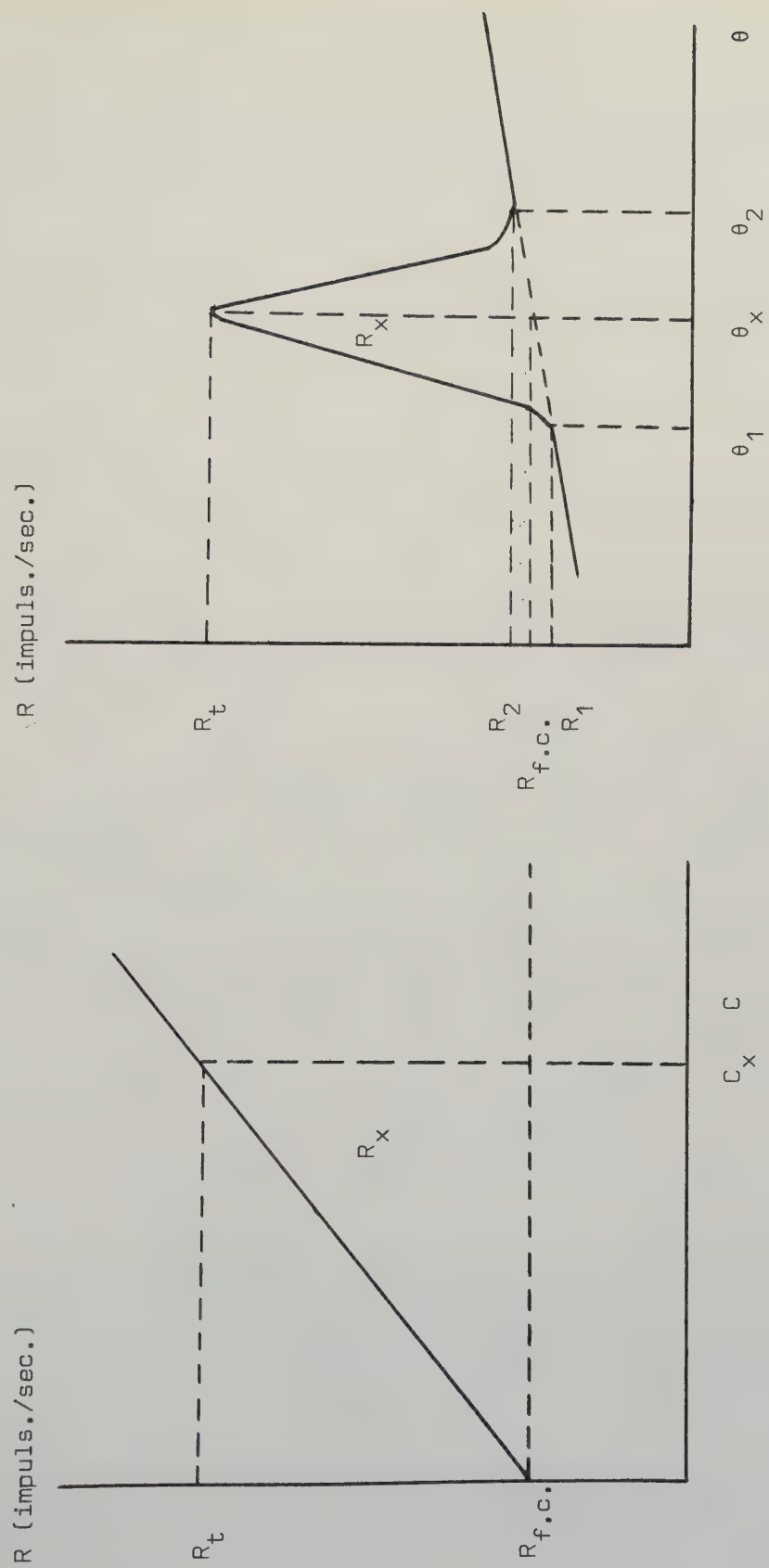


Figure n° 2 - Détermination de la fluorescence de base (méthode du fond continu)

au cours de l'essai à blanc reste constante pour tous les échantillons d'un même milieu analysé, tandis que la mesure du fond continu permet de corriger les variations individuelles de la fluorescence de base quand celle-ci n'est pas exactement identique pour tous les échantillons.

Mais, du point de vue de l'erreur de comptage, la mesure directe de la fluorescence de base est préférable. En effet, si on considère que l'écart-type (s) du taux d'impulsions par seconde (R) est :

$$s = \sqrt{\frac{R}{t}}$$

L'écart-type du nombre d'impulsions (R_x), calculé à l'aide de la relation (1), sera égal à :

$$s_x = \sqrt{\frac{R_b + R_t}{t}} \quad (4)$$

tandis que si R_x est calculé à partir de la relation (3), l'écart-type du nombre d'impulsions (s_x) devient égal à :

$$s_x = \sqrt{\frac{R_t + R_1 + R_2}{t}} \quad (5)$$

Donc, en principe, pour réduire l'erreur introduite par le comptage il est préférable, toutes les fois que cela est possible, d'employer la mesure directe de la fluorescence de base plutôt que sa détermination à l'aide du fond continu. Cette solution présente, en outre, l'avantage d'être plus rapide, puisqu'elle nécessite un moins grand nombre de mesures.

D'autres méthodes ont été proposées pour éliminer indirectement l'interférence du fond spectral dans les déterminations : la méthode utilisant un étalon interne et la méthode des surcharges.

On appelle étalon interne une quantité connue d'un élément qui est ajoutée aux échantillons à analyser et aux échantillons de référence. La concentration de l'élément à doser (C_x) est alors exprimée en fonction du rapport des intensités de fluorescence X de la raie caractéristique de l'élément à doser (R_t) et de celle de la raie caractéristique de l'étalon interne (R_e)

$$C_x = k \cdot \frac{R_t}{R_e}$$

L'étalon interne doit être choisi de telle manière qu'aucune raie de son spectre ne vienne interférer avec la raie mesurée, ou absorber ou exalter cette raie par effet de tiers-élément. Dans certains cas, il est possible d'utiliser le fond continu comme étalon interne. D'après HERTROYS et DE VRIES (34), ce procédé donne des résultats plus précis que la méthode qui consiste à retrancher le fond continu de la fluorescence totale, quand le nombre total d'impulsions comptées est supérieur à 10^6 .

La méthode des surcharges consiste à ajouter à un échantillon identique à celui analysé une quantité déterminée de l'élément recherché. La concentration inconnue (C_x) est alors exprimée en fonction de la surcharge (C_s) et des intensités de fluorescence correspondantes (R_x) et ($R_x + s$), ces dernières étant représentées par les fluorescences totales corrigées en fonction de la fluorescence de base. On peut donc écrire :

$$\frac{C_x}{C_x + C_s} = \frac{R_x}{R_x + s}$$

d'où :

$$C_x = \frac{C_s \cdot R_x}{R_x + s - R_x}$$

V - Critères d'évaluation de la qualité

des méthodes proposées

La qualité d'une méthode d'analyse est conditionnée par sa spécificité et sa précision, qui dépend elle-même de trois facteurs, la sensibilité, la justesse et la fidélité, définis dans la Norme française NFX.05-020 (48).

1 - Sensibilité et limite de détection

La sensibilité (S) est le quotient de l'accroissement de la grandeur mesurée (ΔM) par l'accroissement de la grandeur à mesurer (Δx) :

$$S = \frac{\Delta M}{\Delta x}$$

soit, dans le cas présent, où la grandeur mesurée est représentée par un nombre d'impulsions par seconde (R) et la grandeur à mesurer par une quantité (x) ou une concentration (C_x) :

$$S = \frac{\Delta R}{\Delta x} \quad \text{ou} \quad S = \frac{\Delta R}{\Delta C_x} \quad (6)$$

Pratiquement, dans toutes les méthodes de dosage que nous avons étudiées, la relation entre la quantité de produit recherché (x) ou sa concentration (C_x) et l'intensité de la fluorescence X (R_x) est une fonction linéaire :

$$R_x = mx \quad \text{ou} \quad R_x = m C_x$$

Dans ces conditions, la sensibilité de la méthode est représentée par la pente de la courbe de référence (m), exprimée en impulsions par seconde et par microgramme ou en impulsions par seconde et par ppm.

A la limite de sensibilité, se situe le seuil de détection, défini comme étant la plus faible concentration dont la méthode de dosage permette d'affirmer qu'elle n'est pas nulle.

Dans le cas d'un dosage par spectrométrie de fluorescence X, la

limite de détection (L.D.) est représentée par la concentration de l'élément recherché correspondant à la plus faible intensité de fluorescence qui puisse être mesurée d'une manière significative ($R_{x \text{ min.}}$) :

$$L.D. = \frac{R_{x \text{ min.}}}{m}$$

m représentant la pente de la courbe de référence.

Si l'intensité de la fluorescence propre à l'élément recherché (R_x) est calculée par différence entre l'intensité de la fluorescence totale (R_t) et celle d'un échantillon blanc (R_b), l'écart-type de R_x est égal :

$$s_x = \sqrt{\frac{R_t + R_b}{t}}$$

si le même temps de comptage a été utilisé pour déterminer R_t et R_b .

Pour une probabilité de 99 p.100, $R_{x \text{ min.}}$ sera égal à trois fois la valeur de l'écart-type s_x :

$$R_{x \text{ min.}} = 3 \sqrt{\frac{R_t + R_b}{t}}$$

Comme R_t et R_b , au voisinage du seuil de détection, sont très peu différents l'un de l'autre, on peut écrire :

$$R_{x \text{ min.}} = 3 \sqrt{\frac{2 R_b}{t}} = 3 \sqrt{2} \sqrt{\frac{R_b}{t}}$$

Dans ce cas, la limite de détection est calculée à partir de la relation :

$$L.D. = \frac{3 \sqrt{2}}{m} \sqrt{\frac{R_b}{t}} \quad (7)$$

m étant exprimée en impulsions par seconde et par microgramme ou en impulsions par seconde et par ppm.

Si l'intensité de la fluorescence de base (R_b) est calculée par la méthode du "fond continu", R_x est exprimé par la relation :

$$R_x = R_t - \frac{R_1 + R_2}{2}$$

L'écart-type de R_x (s_x) devient alors :

$$s_x = \sqrt{\frac{R_t + R_1 + R_2}{t}}$$

ou, comme R_t , R_1 et R_2 sont très voisins :

$$s_x = \sqrt{\frac{3 R_1}{t}}$$

Dans ce cas, la limite de détection est calculée à partir de la relation :

$$L.D. = \frac{3\sqrt{3}}{m} \sqrt{\frac{R_1}{t}} \quad (8)$$

m étant exprimée en impulsions par seconde et par microgramme ou en impulsions par seconde et par ppm.

Il doit être souligné que les valeurs ainsi calculées représentent les plus petites quantités ou les plus petites concentrations mesurables d'une manière significative. Mais ces valeurs sont toujours entachées d'une erreur considérable et elles ne doivent pas être confondues avec les limites de dosage. C'est d'ailleurs pourquoi, nous pensons que le terme de limite de détection est plus approprié que celui de limite sensibilité, qui est parfois employé.

2 - Justesse

La justesse d'une méthode est l'accord qui existe entre la valeur vraie (X) et la moyenne des résultats qui serait obtenue en appliquant cette méthode un très grand nombre de fois (x).

Au cours de ce travail, quand nous avons voulu déterminer la justesse d'une méthode que nous étudions, nous avons préparé une série de N échantillons contenant une quantité (X) de toxique mesurée avec précision. Après avoir dosé le toxique dans ces échantillons, nous avons pu établir la moyenne des valeurs trouvées ($\bar{x}$), et calculer son écart de confiance, égal à $\pm t.S_m$, (S_m) représentant l'écart-type de la moyenne et (t) la valeur du coefficient de Student correspondant au degré de liberté (N - 1) pour une probabilité déterminée.

Si la valeur (X) se trouve comprise entre $(x + t.S_m)$ et $(x - t.S_m)$, nous considérons que la méthode n'est pas entachée d'une erreur systématique. Dans le cas contraire, nous concluons que la méthode fournit des résultats entachés d'une erreur systématique par défaut, si $(x + t.S_m)$ est inférieur à (X) ou par excès, si $(x - t.S_m)$ est supérieur à (X).

3 - Fidélité

La fidélité d'une méthode est l'étroitesse de l'accord qui existe entre les valeurs expérimentales obtenues par cette méthode, au cours d'un ensemble d'expériences effectuées dans des conditions bien déterminées. Le critère de la fidélité est représenté par l'écart-type de la série des mesures ou par l'écart de confiance.

Pratiquement, dans un même laboratoire, la fidélité est remplacée par la notion de répétabilité, qui est l'expression quantitative de la fidélité, dans le cas d'un seul opérateur travaillant avec le même matériel et dans les mêmes conditions. Dans ce cas, l'écart-type de la série de mesures ou l'écart de confiance est encore le critère de la répétabilité de la méthode.

VI - Matériel et conditions

de mesure

1 - Spectro-diffractomètre

Dans cette étude, nous avons utilisé un spectro-diffractomètre (Cristallobloc 50 de la Compagnie Générale de Radialogie) équipé :

- de deux anodes tournantes en cuivre portant plusieurs anticathodes obtenues par dépôt électrolytique des métaux choisis ; ce dispositif permet de changer d'anticathode par simple commutation, sans avoir à démonter le tube d'émission ; on dispose ainsi sur deux anodes de neuf anticathodes : cuivre, tungstène, molybdène, cobalt, chrome, argent, nickel, or et fer.

- d'une gamme de cristaux analyseurs plans ou courbes de fluorure de lithium, de quartz ou de gypse ; dans cette étude, nous avons toujours employé des cristaux de fluorure de lithium.

- de trois compteurs interchangeableables : un compteur à scintillation utilisable jusqu'à 2 Å, un compteur proportionnel employé dans une zone de longueurs d'onde comprises entre 1,5 et 4 Å, et un compteur à flux gazeux intéressant pour les grandes longueurs d'onde, puisque son domaine d'utilisation s'étend de 2 à 10 Å.

- d'un bloc de mesures permettant soit l'enregistrement graphique du spectre de fluorescence X, soit la mesure du nombre des impulsions en fonction du temps.

2 - Conditions générales de mesure

Les conditions opératoires qui ont servi à mesurer la fluorescence X des éléments que nous avons étudiés (molybdène, plomb, arsenic, thallium, selenium, mercure, zinc, manganèse, chrome et vanadium), sont rassemblés dans le tableau n° 2.

Ces conditions concernent principalement les divers réglages du spectro-diffractomètre. Elles ont été choisies de manière à obtenir la plus grande sensibilité et la meilleure spécificité. Nous n'avons pas jugé utile de faire figurer dans ce tableau les réglages de discrimination électronique qui ne sont pas exactement reproductibles d'une fois à l'autre et doivent être contrôlés avant chaque série de mesures.

Eléments	Mo	Pb	As	Tl	Se	Hg	Zn	Mn	Cr	V
Montage	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Air	Vide	Vide	Vide
Anode	Ag	Mo	Mo	Mo	Mo	Mo	W	Ni	Fe	Fe
L i F										
Cristal analyseur										
Rayon de courbure en mm	1 400	1 100	1 100	1 100	1 100	1 100	750	500	500	500
Détecteur	Scintillateur									
							CP	C P F G		
Raie mesurée ° en A	K α 0,709	Lβ1β2 0,982	Kα 1,17	Lα1 1,20	Kα1 1,10	Lβ1 1,04	Kα 1,43	Kα1 2,10	Kα1 2,28	Kα 2,50
Temps de mesure en sec.	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

TABLEAU n° 2 - Tableau récapitulatif des conditions de mesures

TROISIEME PARTIE

APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE X A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE DES ELEMENTS TOXIQUES DANS L'ATMOSPHERE

I - Poussières atmosphériques

Cette application paraissait, à priori, présenter peu de difficultés, car il est facile de collecter les poussières de l'atmosphère en aspirant un volume d'air déterminé à travers un filtre capable de remplir ultérieurement le rôle de support des particules, au cours de l'analyse par spectrométrie de fluorescence X.

Si la proportion d'éléments toxiques dans la masse totale des poussières recueillies est relativement grande, on se trouve placé dans des conditions telles que les effets de matrice et de tiers-éléments sont presque négligeables. Le seul obstacle que nous ayons rencontré réside dans la nécessité de pouvoir préparer des échantillons de référence qui possèdent une structure identique à celle des échantillons analysés. En effet, sur le plan pra-

tique, il est impossible de préparer des étalons en déposant sur un filtre des quantités infimes et exactement connues de poussières. Il est donc nécessaire de préparer les échantillons de référence en utilisant des toxiques en solution. Mais lorsqu'une solution est déposée sur le filtre, elle l'imprègne dans toute son épaisseur et, après évaporation du solvant, le toxique se trouve disséminé dans un certain volume de support. Ces conditions sont différentes de celles existant dans la réalité, où les poussières recueillies par aspiration constituent un dépôt très mince à la surface du filtre. Or, la fluorescence X est un phénomène de surface, qui ne concerne qu'une très faible épaisseur des échantillons analysés. Pour reproduire les conditions réelles aussi fidèlement que possible, nous avons eu recours à un artifice qui consiste à imprégner de collodion le filtre qui recevra la solution de référence. Sur ce support hydrophobe, la solution forme une goutte plus ou moins volumineuse qui, après évaporation de l'eau, laisse un dépôt de toxique concentré à la surface du support sous la forme d'une plage circulaire de quelques millimètres de diamètre.

Afin de donner aux filtres qui ont servi à prélever les poussières une structure identique à celle des filtres de référence, nous les imprégnons également de collodion et nous les séchons à l'air avant de procéder aux mesures de fluorescence X.

1 - Principe

Un volume d'air (V) exactement mesuré, est aspiré à travers un disque de papier, maintenu par un support qui permet de concentrer les poussières sur une plage circulaire de 10 mm. de diamètre.

Le filtre est ensuite imprégné de collodion, séché à l'air, et les toxiques minéraux sont dosés en mesurant directement leur fluorescence X sur le filtre ainsi préparé. Les valeurs obtenues sont reportées sur une courbe de référence établie en évaporant des volumes exactement mesurés de solutions titrées de toxiques sur des disques de papier filtre préalablement imprégnés de collodion.

2 - Matériel

A - Porte-filtre (figure n°3)

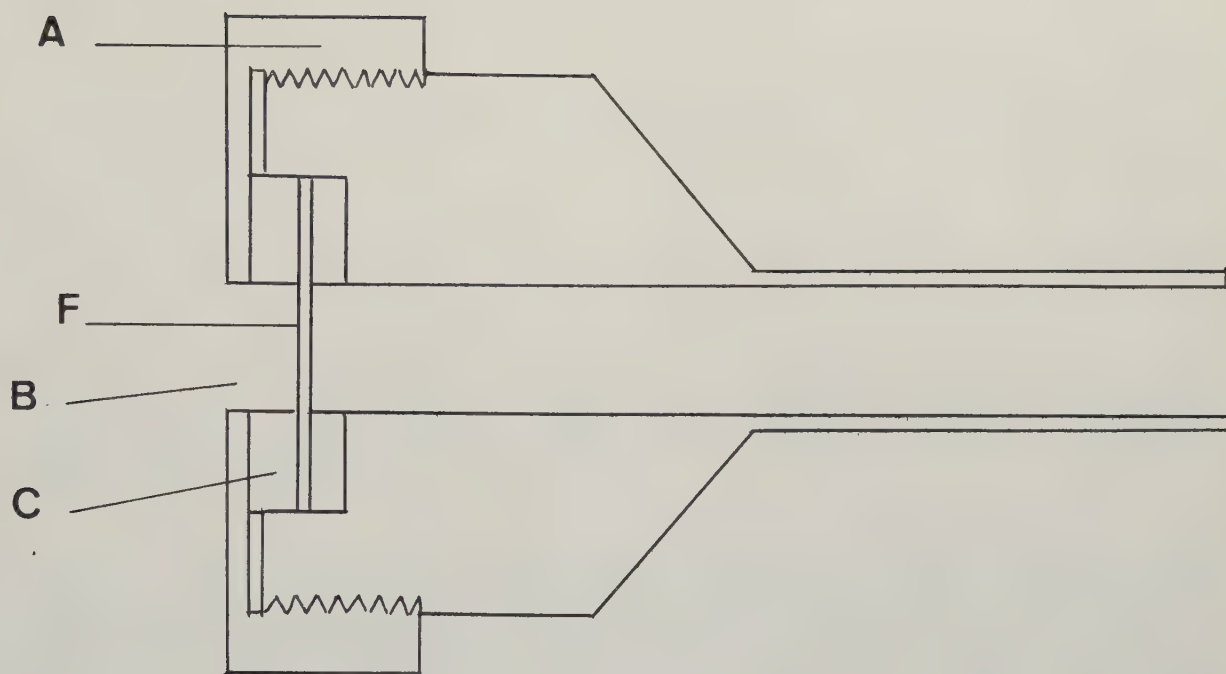


Figure n° 3 - Porte-filtre pour le prélèvement des poussières de l'atmosphère

A - Capuchon molleté à vis

B - Orifice d'aspiration (diam. : 10 mm)

C - Flasques (diam. : 20 mm)

F - Filtre (diam. : 20 mm)

Le filtre est pressé entre deux flasques métalliques percées en leur centre d'un orifice de 10 mm. de diamètre. L'ensemble vient s'encaster dans un support et un capuchon à vis permet de serrer fortement les deux flasques l'une contre l'autre, de manière à ce que l'air ne puisse emprunter d'autre voie que celle qui passe à travers la plage centrale.

Les filtres sont constitués par des disques de 20 mm. de diamètre découpés à l'emporte-pièce dans des feuilles de papier Whatmann n° 1.

B - Dispositif de prélèvement

Le montage utilisé comporte, outre le porte-filtre, un dispositif d'aspiration constitué par une pompe électrique et un compteur à gaz permettant de mesurer des volumes de l'ordre de quelques litres avec une précision suffisante (sensibilité : 1 centilitre).

Dans le montage, il est indispensable de placer le compteur après la pompe, car la présence du filtre sur le trajet suivi par le flux gazeux crée une perte de charge, qui rend la mesure du volume d'air aspiré difficile, si le compteur est placé entre le porte-filtre et la pompe. Cet inconvénient disparaît, quand le compteur est placé à la fin du circuit de prélèvement, puisqu'il se trouve alors à la pression atmosphérique. Une condition est indispensable pour que le volume d'air prélevé à l'aide de ce dispositif soit correctement mesuré : la pompe ne doit pas présenter la moindre fuite. Avant d'entreprendre nos expériences, nous avons vérifié que notre matériel, répondait à cette exigence, en mesurant simultanément le débit de l'air au début et à la fin du circuit.

3 - Mode opératoire

A - Prélèvement des poussières

Le volume d'air qu'il faut aspirer à travers le filtre doit être suffisant pour que la quantité de toxique recueillie soit supérieure à la limite de sensibilité du dosage spectrométrique. En général, pour les toxiques que nous avons étudiés, le volume d'air prélevé doit être voisin de 10 litres.

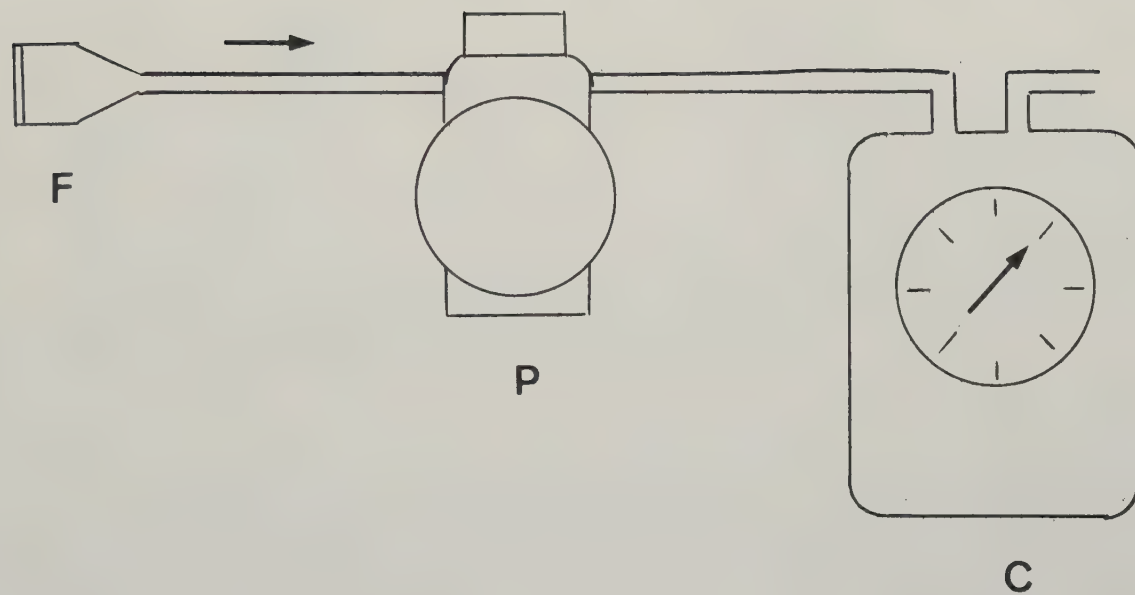


Figure n° 4 - Montage pour le prélèvement des poussières de l'atmosphère

F - Porte-filtre

P - Pompe électrique

C - Compteur volumétrique

A l'issue du prélèvement, le filtre est détaché avec précaution de son support, en s'aidant de brucelles, et six gouttes d'une solution diluée de collodion* sont déposées en divers points du filtre, sur la face opposée à celle où se trouvent les poussières, de manière à réaliser une imprégnation du support aussi homogène que possible. L'évaporation du solvant est pratiquement instantanée.

B - Mesure de la fluorescence X

Le disque de papier filtre est fixé dans le porte-échantillon du spectro-diffractomètre, sur un disque de tungstène ou de molybdène, selon l'élément recherché. Sa fluorescence X est mesurée aux angles correspondant aux divers toxiques, en déterminant chaque fois, le fond spectral aux mêmes angles, sur un filtre vierge imprégné de collodion dilué et séché à l'air. Les réglages que nous utilisons sont indiqués dans le tableau récapitulatif n° 2. La quantité de toxique présente sur le filtre est calculée en rapportant la valeur de la différence ($R_x - R_b$) sur une courbe de référence, établie dans les mêmes conditions de réglage de l'appareil avec des filtres supportant des quantités connues de toxique. Dans cette différence, R_x représente la fluorescence X de l'échantillon inconnu et R_b celle de l'échantillon blanc, exprimées en impulsions par seconde.

4 - Préparation de la gamme de référence

Les échantillons de référence sont préparés en déposant des volumes exactement mesurés d'une solution titrée de toxique sur des disques de papier préalablement imprégnés de collodion et séchés à l'air.

Pour éviter que le liquide ne s'étale sur une plage circulaire trop étendue, plus grande que celle qui est inscrite dans le champ du faisceau de radiations excitatrices, il est indispensable que le volume déposé sur le disque de papier ne dépasse pas quelques dizaines de μ l. Cette condition exige la mesure très précise de petits volumes de solution. De telles mesures peuvent être effectuées à l'aide d'une ultra-microburette ou par un procédé

* solution de collodion diluée au 1/5 dans un mélange à parties égales d'éther et d'éthanol.

gravimétrique. C'est ce procédé que nous avons utilisé. Les solutions titrées sont préparées avec des sels solubles d'éléments toxiques ; leur concentration est, en général, d'un milligramme de toxique par gramme de solution. Un faible volume de solution est aspiré dans une pipette Pasteur à pointe très effilée ; la pipette est essuyée avec un papier Joseph et tarée sur une balance de précision (au 1/100 de mg.). Ensuite, on pose la pointe de la pipette sur le disque de papier filtre et on laisse écouler, par capillarité, une goutte de solution, dont le poids exact est déterminé par une nouvelle pesée de la pipette. L'opération est renouvelée en déposant sur les filtres des gouttes de solution de volumes croissants. Ces gouttes sont ensuite évaporées sous vide phosphorique.

A partir du poids de solution mesuré et de la concentration de solution, on détermine la quantité exacte de toxique déposé sur chaque filtre.

En général, nous déterminons quatre points d'une courbe de référence, avec des quantités de toxiques voisines de 10, 20, 30 et 40 μg .

5 - Discussion de la méthode

A - Prélèvement des poussières

Du fait de la nécessité de concentrer les poussières collectées sur une surface circulaire, dont le diamètre n'excède pas 10 mm., le débit de l'air à travers le filtre est faible et il est impossible de chercher à l'augmenter en utilisant des papiers trop poreux, sous peine de ne plus retenir les poussières de très petites dimensions. Mais il n'est pas pour autant nécessaire de filtrer un volume d'air trop considérable, car l'analyse par fluorescence X, dans ce cas particulier, présente une très grande sensibilité.

B - Mesure de la fluorescence X

Deux techniques sont susceptibles de servir à l'identification des éléments toxiques recueillis sur les filtres. L'une consiste à enregistrer un spectre de fluorescence X ; la présence des toxiques est alors révélée par l'existence de pics, qui apparaissent sur l'enregistrement à des angles déterminés. Dans l'autre méthode, on effectue directement le dosage des to-

xiques en mesurant la fluorescence X à des angles correspondant à une raie caractéristique de chacun d'eux.

Le second procédé nous paraît préférable, car il est plus rapide et surtout plus sensible, étant donné que les mesures de fluorescence X sont effectuées dans des conditions de réglage spécialement adaptées à chacun des éléments recherchés.

C - Evaluation de la qualité de la méthode

a - Sensibilité et limite de détection

La sensibilité et le seuil de détection ont été calculés pour la quantité de toxique présente sur le filtre et pour la concentration dans l'atmosphère, quand le volume d'air prélevé est de 10 litres.

Ces données, établies pour huit toxiques en appliquant les relations (6) et (8) sont rassemblées dans le tableau n° 3.

Si l'on compare les seuils de détection dans l'air avec les concentrations maximales tolérables (C.M.T.) dans l'atmosphère des locaux de travail, qui ont été adoptées lors du XVIII^e Congrès des Hygiénistes Industriels Gouvernementaux des U.S.A. (61), on constate que tous ces seuils de détection sont très inférieurs aux concentrations maximales tolérables.

b - Justesse

Dans le cas particulier des poussières, le procédé général indiqué au paragraphe (V,2) de la deuxième partie pour déterminer la justesse d'une méthode de dosage n'est plus applicable, puisqu'il est impossible de déposer sur des filtres des quantités de poussières de l'ordre de quelques μg qui soient connues avec précision. Nous avons eu recours à un autre procédé, qui consiste à rechercher la corrélation existant entre la méthode étudiée et des méthodes physico-chimiques déjà éprouvées. Dans ce but, nous avons recueilli une quantité indéterminée de poussières toxiques, en aspirant à travers des filtres un mélange d'air et de poussières préparé artificiellement ; puis, nous avons dosé les toxiques sur les filtres, d'abord par fluorescence X selon la méthode proposée, puis par les méthodes physico-chimiques appropriées, après minéralisation.

Eléments	Sensibilité	Seuil de détection Sur le filtre	Seuil de détection dans l'air *	L. M. T.
	Imp./sec./ μg	μg	mg/m^3	mg/m^3
Vanadium	20,0	0,13	0,01	0,1 (V_2O_5)
Chrome	22,0	0,14	0,01	0,5
Manganèse	26,0	0,14	0,01	5,0
Zinc	40,2	0,19	0,01	5,0 (ZnO)
Arsenic	7,0	0,75	0,07	0,5
Selenium	13,5	0,72	0,07	0,2
Molybdène	10,0	1,65	0,16	5,0
Thallium	9,0	1,38	0,13	0,1
Plomb	2,9	1,65	0,16	0,2

* pour un prélèvement de 10 litres d'air.

TABEAU n° 3 - Dosage des toxiques dans les poussières de l'atmosphère

Sensibilités et limites de détection

Les méthodes de référence utilisées reposent sur les principes suivants :

- dosage de l'arsenic : minéralisation par le chlore naissant et dosage de l'arsenic par la méthode de CRIBIER.

- dosage du plomb : calcination en présence d'acide nitrique, puis reprise des cendres par une solution de citrate d'ammonium à 15 p.100 et dosage du plomb par polarographie.

- dosage du manganèse : calcination en présence d'acide nitrique, puis reprise des cendres par l'acide chlorhydrique ; évaporation à sec et dissolution du résidu dans une solution de chlorure de lithium 0,01 M ; dosage du manganèse par polarographie.

- dosage du zinc : calcination en présence d'acide nitrique, puis reprise des cendres par l'acide chlorhydrique ; évaporation à sec, dissolution du résidu dans une solution de thiocyanate de potassium 0,025 M et d'acétate d'ammonium 0,01 M ; dosage du zinc par polarographie.

- dosage du vanadium : calcination en présence d'acide nitrique, dissolution des cendres dans l'acide sulfurique 0,5 N ; dosage spectrophotométrique du vanadium à l'état d'acide phosphovanadotungstique.

Les résultats des deux séries de dosage sont réunis dans le tableau n° 4 et représentés sur la figure n° 5. Les différences qui existent entre les valeurs trouvées par la méthode de fluorescence X et celles obtenues par les méthodes physico-chimiques restent comprises entre ± 10 p.100 (sauf dans un cas, où elle atteint 29,3 p.100) pour des quantités de toxiques allant de 10 à 138 μg . On peut donc considérer qu'il existe une bonne corrélation entre les résultats des deux types de méthode.

La méthode proposée pour doser les éléments toxiques contenus dans les poussières de l'atmosphère paraît intéressante, car elle offre deux avantages. En premier lieu, elle est simple et très rapide, puisqu'elle permet d'effectuer un dosage en cinq minutes. L'opération la plus longue est représentée par la préparation des échantillons de référence. Mais cette opération ne doit être effectuée qu'une seule fois, car la conservation de ces échantillons est excellente, s'ils sont maintenus à l'abri de l'humidité et de la poussière. De plus, cette méthode peut être étendue à un grand nombre d'éléments toxiques, en particulier à ceux qui sont difficilement dosables par des méthodes physico-chimiques usuelles.

Eléments	Sels utilisés	Résultats par fluorescence X - µg -	Résultats par les méthodes physico-chimiques - µg -	Différence p.100
Arsenic	$S_3 As_2$	28 42 54 71	26 40 60 70	+ 7 + 5 - 10 + 1,4
Plomb	$Pb Cr O_4$	40 59 63	37 60 69	+ 8,1 - 1,6 - 8,6
Manganèse	$K Mn O_4$	15,5 55 92	14 56 91,5	+ 10,7 + 1,7 + 0,5
Zinc	$Zn Cr O_4$	37,5 50,5 135	29 48 138	+ 29,3 + 5,2 - 2,1
Vanadium	$NH_4 V O_3$	10,5 28,1 37	10 31,5 38,4	+ 5 - 10,7 - 3,6

TABLEAU n° 4 - Dosage des toxiques dans les poussières de l'atmosphère
 Comparaison des résultats obtenus par la fluorescence X
 et par les méthodes physico-chimiques

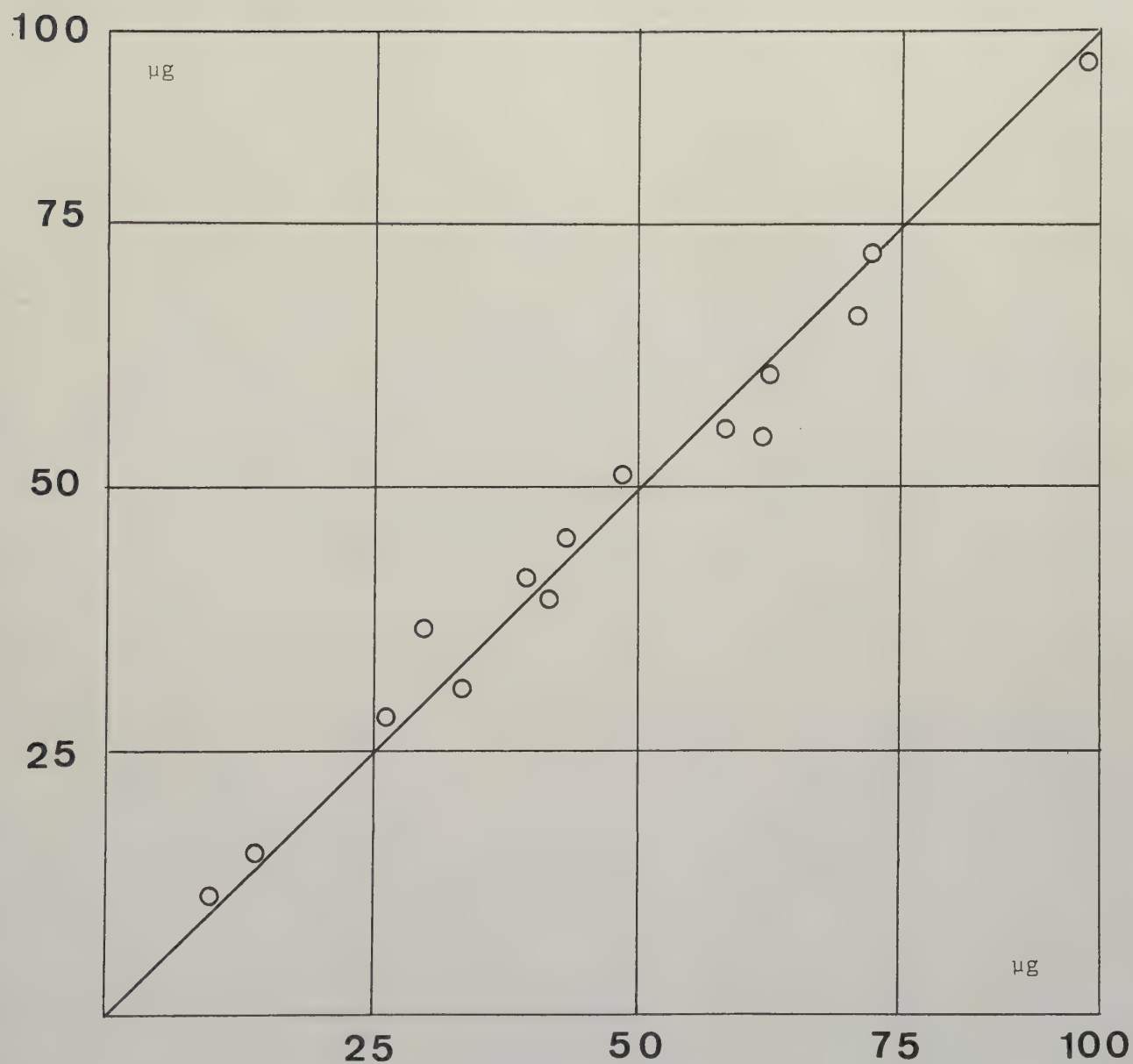


Figure n° 5 - Dosage des éléments toxiques dans les poussières de l'atmosphère

ordonnées : résultats obtenus par fluorescence X

abscisses : résultats obtenus par les méthodes physico-chimiques

En outre, la méthode par spectrométrie de fluorescence X présente une justesse comparable à celle des autres méthodes physico-chimiques et une sensibilité suffisante pour permettre le dosage des toxiques à des concentrations maximales tolérables.

II - Gaz toxiques

La spectrométrie de fluorescence X semble pouvoir être appliquée au dosage des toxiques gazeux dans l'atmosphère, s'ils satisfont à deux conditions : il faut qu'ils renferment dans leurs molécules un atome dont la fluorescence X est mesurable et ils doivent pouvoir former une combinaison stable avec un réactif fixé sur un filtre, à travers lequel il est possible de faire passer l'air que l'on désire analyser.

Le meilleur exemple de ces toxiques est l'hydrogène arsénié (As H_3), qui peut réagir avec le chlorure mercurique pour former des comple-

xes colorés en brun. Cette réaction est à la base de la méthode de CRIBIER pour le dosage de l'arsenic dans les liquides de minéralisation. Par ailleurs, l'hydrogène arsénié est un gaz très toxique (C.M.T. = 0,2 mg/m³) difficile à doser dans l'atmosphère à de très faibles concentrations. Pour ces diverses raisons, c'est lui que nous avons choisi quand nous nous sommes proposés d'étudier l'application de la spectrométrie de fluorescence X au dosage de certains toxiques gazeux dans l'atmosphère.

1 - Principe

Un volume d'air exactement mesuré est aspiré à travers trois disques de papier préalablement imprégnés d'une solution de chlorure mercurique et séchés. L'hydrogène arsénié est retenu sur les filtres à l'état de complexes et la fluorescence X de l'arsenic est mesurée directement sur ces filtres.

Les valeurs trouvées, comparées à celles obtenues à partir d'échantillons de référence permettent de déterminer la quantité d'hydrogène arsénié fixée par chacun des trois filtres. Le taux d'hydrogène arsénié contenu dans l'air analysé est calculé en faisant la somme de ces quantités et en la rapportant au volume d'air qui a été aspiré à travers les filtres.

2 - Matériel

A - Porte-filtre

Le porte-filtre est identique à celui utilisé pour l'analyse des poussières de l'atmosphère. Toutefois, si cet appareil a été fabriqué avec un alliage d'aluminium, il est indispensable de protéger les deux flasques qui se trouvent en contact avec les papiers réactifs par un revêtement en matière plastique, afin d'éviter la réaction entre l'aluminium et l'ion mercurique qui entraîne leur détérioration.

Les filtres sont constitués par des disques de 20 mm de diamètre, découpés à l'emporte-pièce dans une feuille de papier Whatmann n° 1, préalablement imprégnée d'une solution aqueuse de chlorure mercurique à 5 p.100, et séchée à l'abri de la lumière.

C - Dispositif de prélèvement

Le montage ne diffère de celui utilisé pour prélever les poussières de l'atmosphère que par le type de la pompe d'aspiration. Le débit de l'air à travers les filtres ne devant pas dépasser 0,5 l/min., la pompe à piston est remplacée par une pompe à membrane.

3 - Mode opératoire

Trois disques de papier réactif superposés, sont pressés entre les flasques du porte-filtre en serrant le capuchon fileté. Un volume d'air exactement mesuré, voisin de 20 litres, est aspiré à travers le dispositif sous un débit de 0,5 l/min. environ.

La fluorescence X de la raie $K\alpha$ de l'arsenic est mesurée directement sur la face des papiers réactifs qui a été exposée au flux gazeux, en prenant comme échantillon blanc, un disque de papier réactif vierge.

4 - Préparation de la gamme de référence

Pour préparer la gamme de référence, il est nécessaire de faire passer à travers des disques de papier réactif une quantité déterminée d'hydrogène arsénié. Cette opération a été réalisée selon une technique inspirée de la méthode de CRIBIER.

Dans le flacon d'un appareil de CRIBIER, on mesure un volume déterminé d'une solution titrée d'anhydride arsénieux contenant 1 μg d'arsenic/ml.

En général, nous préparons six échantillons de référence avec des quantités d'arsenic égales à 2, 4, 6, 8, 10 et 15 μg . (figure n° 6). On ajoute dans le flacon 100 ml d'eau distillée, puis 15 ml d'acide sulfurique pur, et, au moment de mettre en place le tube à dégagement, 8 g. de grenaille de zinc pur, activé.

Au préalable, un porte-filtre garni d'un seul disque de papier réactif a été fixé au moyen d'un collier de caoutchouc sur l'extrémité du tube à dégagement de l'appareil de CRIBIER, afin que le courant d'hydrogène qui entraîne l'hydrogène arsénié traverse le papier réactif.

Dans ces conditions, la vitesse de passage de l'hydrogène arsénié est suffisamment lente pour que ce gaz soit retenu en totalité par le papier réactif.

5 - Discussion de la méthode

A - Prélèvement des échantillons

Au cours d'essais préliminaires, nous avons observé qu'un seul filtre de papier au chlorure mercurique ne retient qu'une fraction de l'hydrogène arsénié présent dans l'air analysé, dès que ce dernier est aspiré avec un débit supérieur à quelques dizaines de ml par minute. Une vitesse de passage aussi réduite n'est guère compatible avec les conditions pratiques des dosages, car elle prolonge la durée des prélèvements d'une manière excessive, quand il faut faire passer à travers le papier réactif un volume d'air voisin de 20 litres, nécessaire pour arriver à une sensibilité suffisante.

C'est pour remédier à cet inconvénient que nous avons étudié la solution, qui consiste à faire passer l'air prélevé à travers trois disques de papier réactif superposés et à doser l'hydrogène arsénié retenu sur chacun des disques. Il est alors possible d'utiliser une vitesse de prélèvement qui atteint 0,5 l/m, sans perte appréciable d'hydrogène arsénié.

Les résultats rapportés dans le tableau n° 5 montrent en effet que pour un tel débit la quantité d'arsenic trouvée sur le troisième filtre ne représente qu'une fraction infime de la quantité totale retenue par l'ensemble des trois filtres.

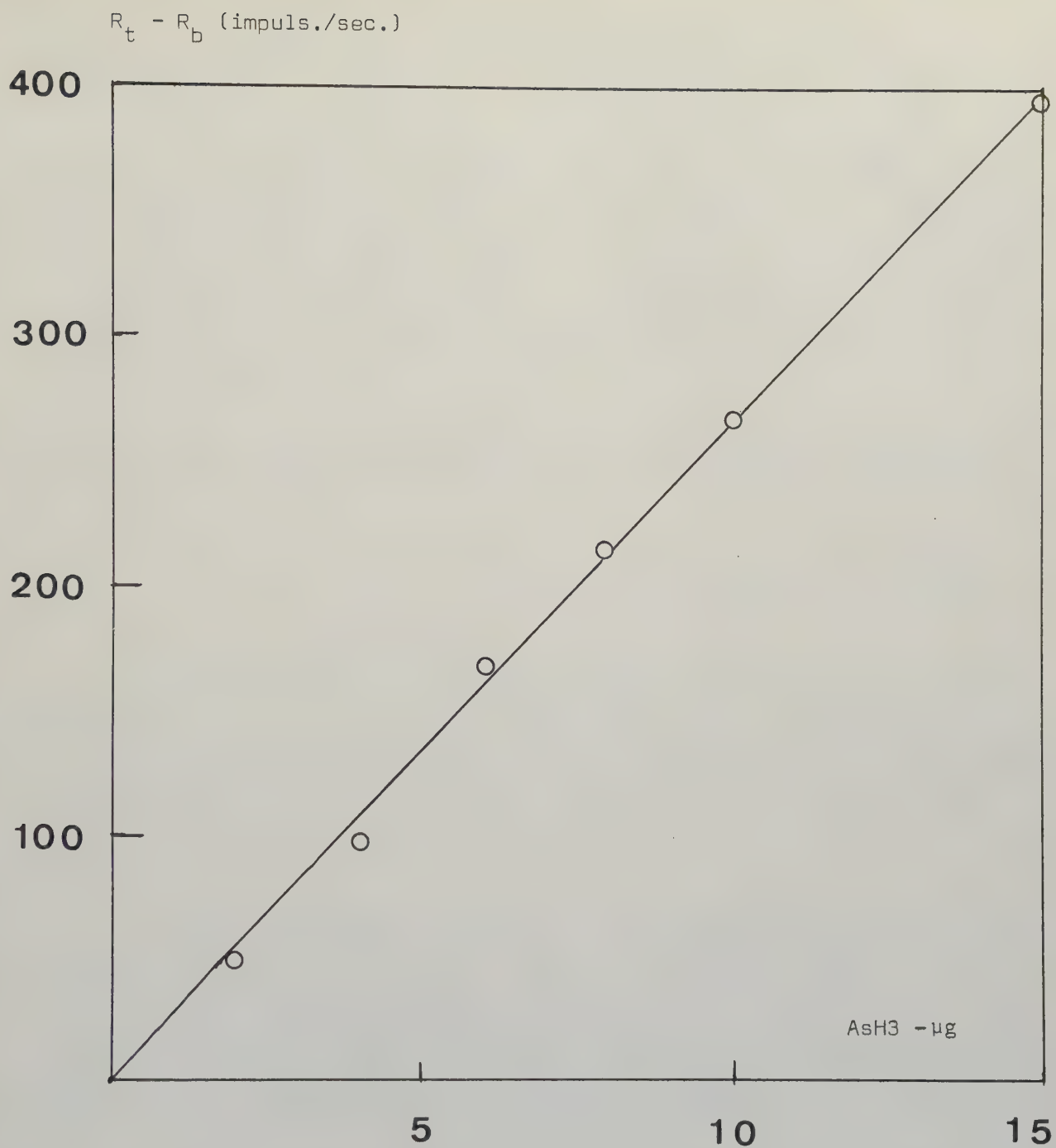


Figure n° 6 - Dosage de l'hydrogène arsénié dans l'air

- courbe de référence -

B - Mesure de la fluorescence X

Dans la méthode de CRIBIER, il est nécessaire de révéler et de fixer la tache formée par les complexes arsénio-mercuriels en immergeant les papiers réactifs dans une solution d'iodure de potassium à 10 p.100. Les essais comparatifs que nous avons effectués en mesurant la fluorescence X sur des papiers réactifs, avant et après leur lavage avec une solution d'iodure de potassium, nous ont montré que si ce traitement améliore la sensibilité en diminuant la fluorescence X de base, il entraîne par contre une grande dispersion des résultats, dûe vraisemblablement à des pertes de complexes arsénio-mercuriels.

Le lavage des papiers réactifs dans une solution d'iodure de potassium avant la mesure de la fluorescence X n'est donc pas à recommander.

C - Evaluation de la qualité de la méthode

Comme il est très difficile du point de vue pratique de préparer des dilutions exactes d'hydrogène arsénié dans l'air à des concentrations très faibles, nous n'avons pas pu étudier la justesse de la méthode que nous proposons. Nous nous sommes limités à la détermination de l'écart de confiance, en effectuant plusieurs séries de déterminations sur des échantillons d'air, auxquels nous avons ajouté de l'hydrogène arsénié en proportions connues d'une manière approximative.

Pour préparer ces échantillons, nous avons mesuré 80 litres d'air dans un sac de DOUGLAS d'une capacité de 100 litres, puis nous avons fait dégager dans ce sac de caoutchouc, le courant d'hydrogène produit par un appareil de CRIBIER dans lequel nous avons introduit, sous la forme d'anhydride arsénieux, des quantités d'arsenic égales à 60, 80 ou 100 μg ; correspondant à des concentrations théoriques d'hydrogène arsénié dans le mélange gazeux respectivement égales à 0,77, 1,03 et 1,30 mg/m^3 . Ensuite, nous avons effectué six dosages sur chacun des mélanges préparés.

Ainsi que le montrent les résultats qui figurent dans le tableau n° 5, les taux d'hydrogène arsénié sont tous inférieurs aux concentrations théoriques. Les pertes constatées sont dûes à un phénomène connu : une petite fraction du gaz toxique est retenue par adsorption sur la paroi en caoutchouc du sac de DOUGLAS. Elles ne proviennent donc pas d'un défaut de la méthode d'analyse, mais du mode de préparation du mélange gazeux.

Série des mesures	Quantités d'As ₂ O ₃ fixées - ug -				concentrations trouvées As H ₃ -mg/m ³	Moyenne des concentrations -mg/m ³ - et écart de confiance prob. 99 p. 100
	sur le filtre 1 x ₁	sur le filtre 2 x ₂	sur le filtre 3 x ₃	somme x ₁ +x ₂ +x ₃		
Série I	2,64	0,86	0,72	4,22	0,861	0,82 + 5 p. 100 - 5 p. 100
	1,84	1,45	0,59	3,88	0,812	
	2,24	0,99	0,92	4,15	0,867	
	2,50	1,12	0,39	4,01	0,840	
	2,37	0,66	0,53	3,56	0,743	
Série II	9,19	0,25	0,19	9,63	1,002	1,05 + 7 p. 100 - 7 p. 100
	9,38	0,75	0,12	10,25	1,157	
	7,43	3,40	0,25	11,08	1,153	
	8,56	0,69	0,25	9,50	0,989	
	10,20	0,12	0,00	10,32	1,074	
Série III	4,55	1,08	0,47	6,10	0,63	,59 + 7 p. 100 - 7 p. 100
	3,94	1,15	0,68	5,77	0,60	
	4,55	0,27	0,47	5,29	0,55	
	5,85	0,40	0,00	6,25	0,59	
	4,55	1,15	0,00	5,70	0,59	

TABLEAU n° 5 - Dosage de l'hydrogène arsénié dans l'atmosphère

Les écarts de confiance calculés à partir des résultats de chaque série de six dosages sont de l'ordre de ± 7 à 8 p.100 pour des concentrations d'hydrogène arsénié comprises entre $0,5$ et $1,0$ mg/m³.

Le seuil de détection déterminé sur le premier des trois papiers réactifs est égal à $0,020$ mg/m³ pour un prélèvement d'air de 20 litres. Il est très inférieur à la concentration maximale tolérable dans les locaux industriels ($0,2$ mg/m³). La méthode peut donc servir au dosage de l'hydrogène arsénié en Toxicologie professionnelle.

En ce qui concerne la spécificité, cette méthode paraît très sûre. Deux gaz toxiques, qui accompagnent fréquemment l'hydrogène arsénié dans l'air, l'hydrogène sulfuré et l'hydrogène phosphoré et qui réagissent également avec le papier au chlorure mercurique, ne peuvent pas interférer dans les mesures de fluorescence X de l'arsenic, car les raies K α du soufre et du phosphore ont des longueurs d'onde beaucoup plus grandes que celle de l'arsenic.

Toutefois, la présence d'hydrogène sulfuré dans l'air, à de fortes concentrations, peut constituer une source d'erreur. Il agit en consommant une fraction importante du chlorure mercurique présent sur le filtre qui n'est plus en quantité suffisante pour retenir efficacement l'hydrogène arsénié. C'est pour éviter cet inconvénient que nous conseillons de faire passer l'air à travers un tube garni de gel de silice imprégné d'acétate de plomb, placé avant les papiers au chlorure mercurique, quand cet air est chargé d'hydrogène sulfuré.

Cette méthode, qui s'est révélée satisfaisante pour doser l'hydrogène arsénié dans l'air est susceptible d'être étendue au dosage d'un certain nombre d'autres gaz toxiques, qui peuvent également être retenus par un papier réactif, notamment l'hydrogène sulfuré (SH₂) et l'hydrogène phosphoré (PH₃).

L'hydrogène sulfuré doit pouvoir être dosé en mesurant la fluorescence X de la raie K α du soufre sur un papier imprégné d'acétate de plomb à travers lequel on aura fait passer l'air analysé ; l'hydrogène phosphoré doit pouvoir être dosé de la même manière, en mesurant la fluorescence X de la raie K α du phosphore sur un papier imprégné de chlorure mercurique.

Il devrait même être possible de doser les trois gaz toxiques (l'hydrogène arsénié, l'hydrogène sulfuré et l'hydrogène phosphoré), les uns en présence des autres, en superposant des disques de papier réactif à l'acétate de plomb et des disques imprégnés de chlorure mercurique.

QUATRIEME PARTIE

APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE X A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE DES TOXIQUES MINERAUX DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

Suivant le plan que nous avons adopté, nous avons expérimenté successivement les deux types de méthode qui nous ont paru utilisables pour doser les toxiques minéraux dans un milieu biologique complexe à l'aide de la spectrométrie de fluorescence X. Nous avons commencé par la méthode la plus simple et la plus rapide, celle qui consiste à mesurer directement la fluorescence X sur les échantillons de tissus préalablement desséchés et réduits en poudre. Ensuite, nous avons étudié des procédés plus complexes, qui imposent plusieurs opérations préalables avant l'examen par spectrométrie de fluorescence X : la destruction des matières organiques et la concentration des éléments toxiques par des méthodes d'enrichissement.

I - Analyse directe

des milieux biologiques desséchés

Nous avons été amenés à établir une distinction entre deux catégories de toxiques : ceux qui existent normalement dans les tissus biologiques à des taux, dits "taux physiologiques", qui sont inférieurs aux seuils de détection de la méthode d'analyse et ceux dont les taux normaux dans les milieux biologiques sont trop élevés pour pouvoir être considérés comme négligeables. Dans le premier cas, il est possible de se procurer des échantil-

lons de tissus, tenus pour exempts de toxique, à partir desquels il est possible de préparer des étalons externes en leur ajoutant des quantités déterminées des éléments en cause. Cette façon de procéder n'est plus utilisable dans le second cas ; il devient alors nécessaire de recourir à une méthode différente pour préparer les échantillons de référence.

1 - Toxiques minéraux dont les taux normaux dans les tissus sont inférieurs
aux seuils de détection de la méthode d'analyse

A - Méthode avec étalons externes

a - Principe

Un fragment de tissu d'un poids voisin de 3 g. et exactement connu, est broyé dans l'eau distillée. Le broyat obtenu est lyophilisé ou désséché sous vide phosphorique à froid.

S'il s'agit d'une analyse de sang, il suffit d'évaporer sous vide phosphorique une prise d'essai de 3 ml.

Le résidu sec est pesé, puis broyé jusqu'à obtention d'une poudre fine et homogène. Une fraction de la poudre obtenue (500 mg) est comprimée de manière à former une pastille sur laquelle on mesure la fluorescence X de chacun des éléments toxiques que l'on désire rechercher ou doser.

Les fluorescences mesurées (R_t), corrigées en fonction du fond continu ($R_{f.c.}$) sont reportées sur des courbes de référence :

$$R_t - R_{f.c.} = m C$$

établies avec des pastilles préparées à partir de broyats de tissus auxquels ont été ajoutées des quantités croissantes des toxiques recherchés.

Les courbes de référence doivent être nécessairement établies avec des tissus analogues à celui analysé, c'est-à-dire, provenant d'un organe identique et issu de la même espèce animale. Ces concentrations trouvées peuvent être exprimées par rapport au poids de tissu frais ou de tissu desséché.

b - Mode opératoire

- Broyage

Le fragment d'organe analysé est pesé dans un tube de polyéthylène de 30 mm de diamètre et de 10 cm de longueur. Après addition de 10 ml d'eau distillée, il est broyé à l'aide d'un appareil à grande vitesse de rotation (micro-broyeur Ultra-Turrax).

- Elimination de l'eau

Cette opération peut être effectuée par lyophilisation ou par dessiccation sous vide phosphorique.

Dans le premier cas, le broyat est transvasé dans un flacon de 250 ml et le tube en polyéthylène est rincé avec quelques ml d'eau distillée. Le flacon est introduit dans le lyophiliseur, où il est refroidi à -40° avant d'être soumis à un vide de 10^{-3} mm. de mercure. L'appareil que nous avons utilisé est un lyophiliseur "Delta" (MARTIN-CHRIST).

A défaut de lyophilisation, on peut avoir recours à l'évaporation sous vide phosphorique : le broyat est étalé dans une boîte de Pétri en polyéthylène de grand diamètre, de façon à réaliser une couche mince dont l'eau pourra s'évaporer rapidement. Cette boîte est ensuite placée sous vide phosphorique jusqu'à dessiccation complète et obtention d'un résidu friable.

- Préparation des pastilles

Le résidu sec est pesé et finement broyé, soit à la main dans un mortier d'agate, soit à l'aide d'un broyeur automatique "Mixer-Mill" (SPEX), équipé d'un cylindre d'une capacité de 2 ml. et de billes d'agate, pendant dix minutes.

Environ 500 mg de la poudre obtenue sont introduits dans un moule à pastiller de 20 mm. de diamètre et comprimés sous une pression de 80 Kg par cm^2 .

- Mesure de la fluorescence

La pastille est fixée dans le porte-échantillon du spectro-diffractomètre sur un disque de molybdène ou de tungstène, selon l'élément recherché.

La fluorescence X de chacun des éléments est mesurée sur cette pastille, dans les conditions de réglage qui sont indiquées dans le tableau n°2.

Chaque mesure de fluorescence totale est complétée par la détermination du fond continu, selon le mode de calcul exposé au paragraphe IV de la deuxième partie.

c - Préparation de la gamme de référence

Un fragment de tissu analogue à celui analysé pesant exactement 20 g., est broyé dans 40 ml. d'eau distillée. On obtient ainsi un broyat dont 3 g. correspondent à 1 g. de tissu frais.

Ce broyat est réparti, par fractions de 6g. dans six petits pèse-filtres en polyéthylène tarés. L'une de ces fractions sert d'échantillon blanc ; les cinq autres sont additionnées de quantités connues de toxiques 10, 20, 40, 60 et 80 µg, sous la forme de solutions à 10, 20, 40, 60 et 80 µg/ml, dont on ajoute 1 ml dans chacun des pèse-filtres. On mélange la solution et le broyat à l'aide d'un agitateur et on place les pèse-filtres sous vide phosphorique jusqu'à dessiccation complète.

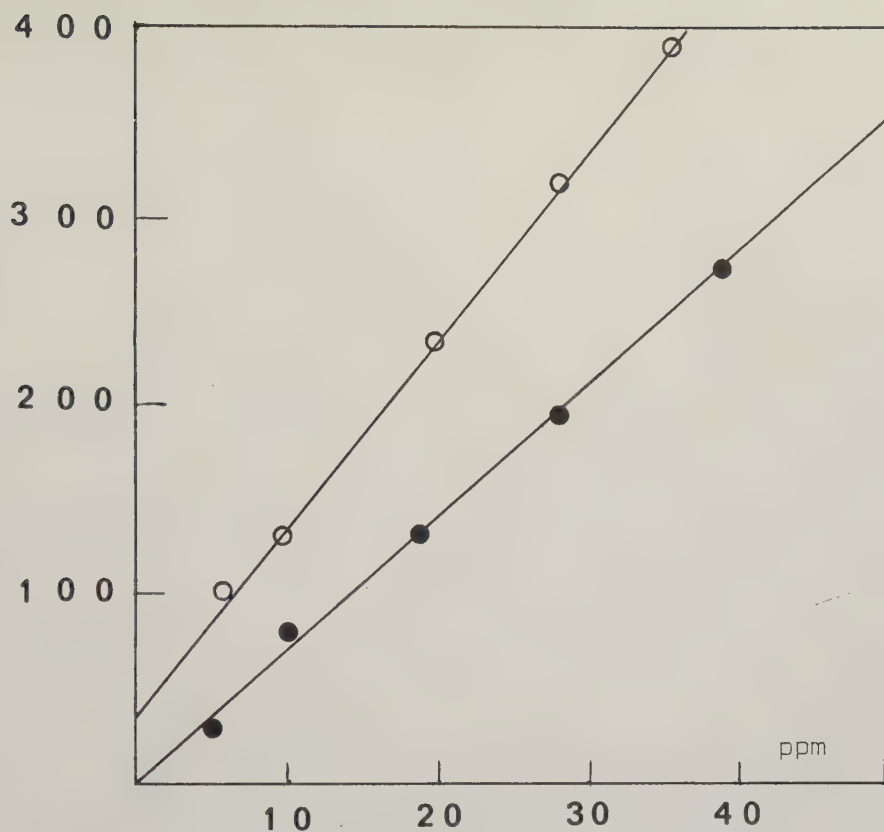
Le poids de chacun des résidus secs est déterminé par pesée. Ces poids servent à vérifier que toutes les prises d'essai sont identiques et par conséquent que le broyat est homogène.

Les résidus secs sont pulvérisés et 500 mg de chaque poudre obtenue servent à préparer une pastille, selon le mode opératoire indiqué au paragraphe précédent.

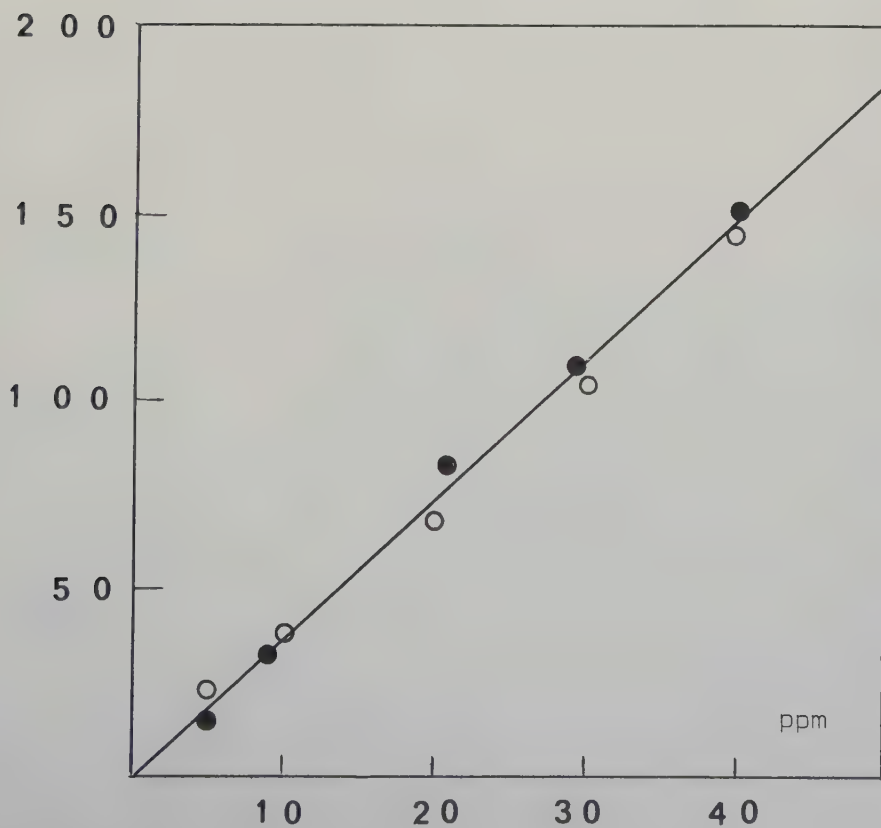
Préservées de l'humidité de l'air, ces pastilles de référence sont pratiquement inaltérables. Afin de les protéger, nous les conservons dans des boîtes individuelles en matière plastique, de 22 mm. de diamètre.

Nous avons reproduit sur les figures n° 7 - 8 - 9 - 10 - 11 - 12 et 13, les courbes de référence établies pour sept toxiques dans divers or-

$$R_t - R_{f.c.} \text{ (impuls./sec.)}$$



$$R_t - R_{f.c.} \text{ (impuls./sec.)}$$



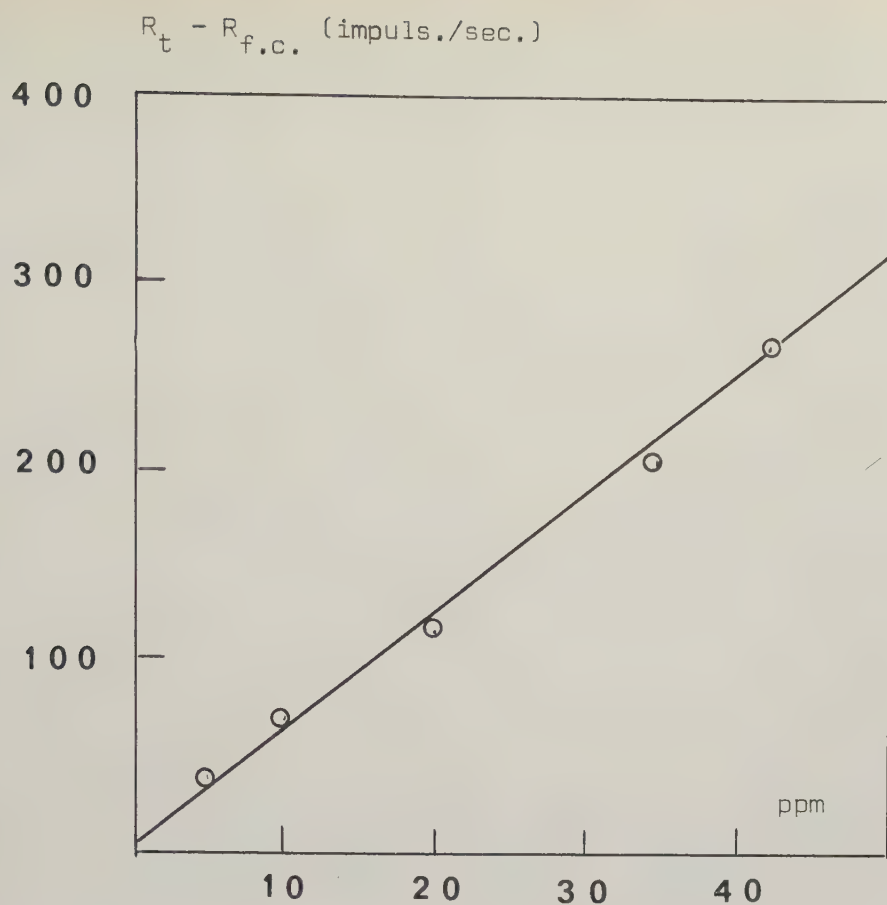


Figure n° 9

Dosage de l'arsenic
dans le foie

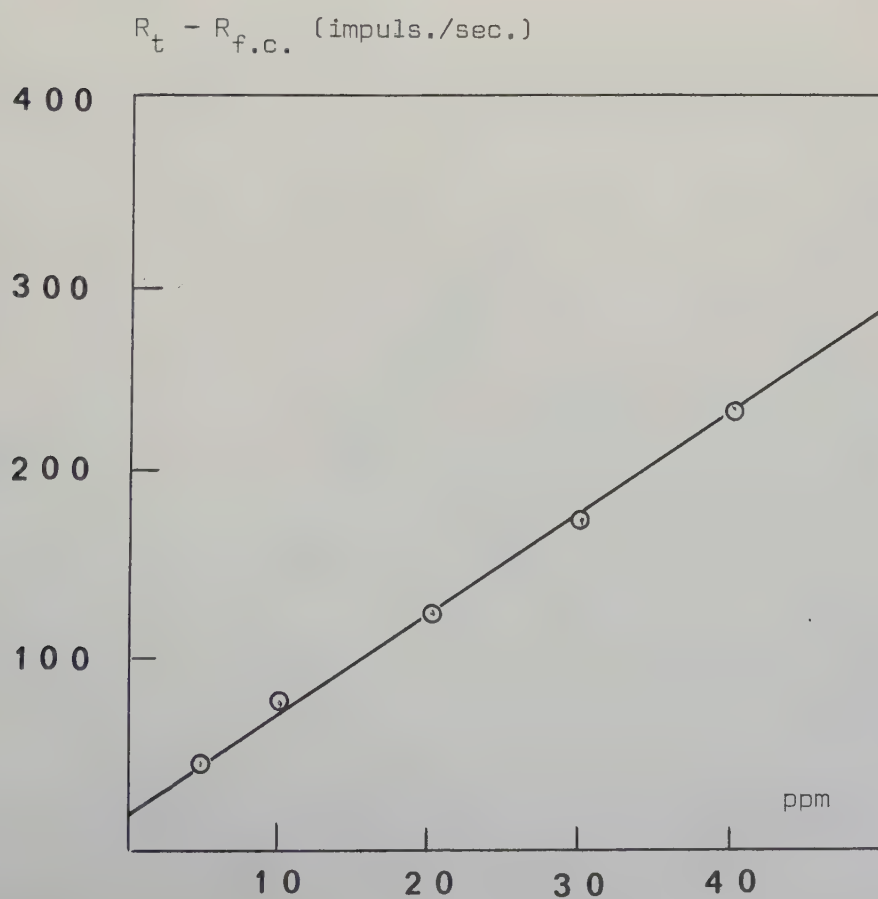


Figure n° 10

Dosage du molybdène
dans le poumon

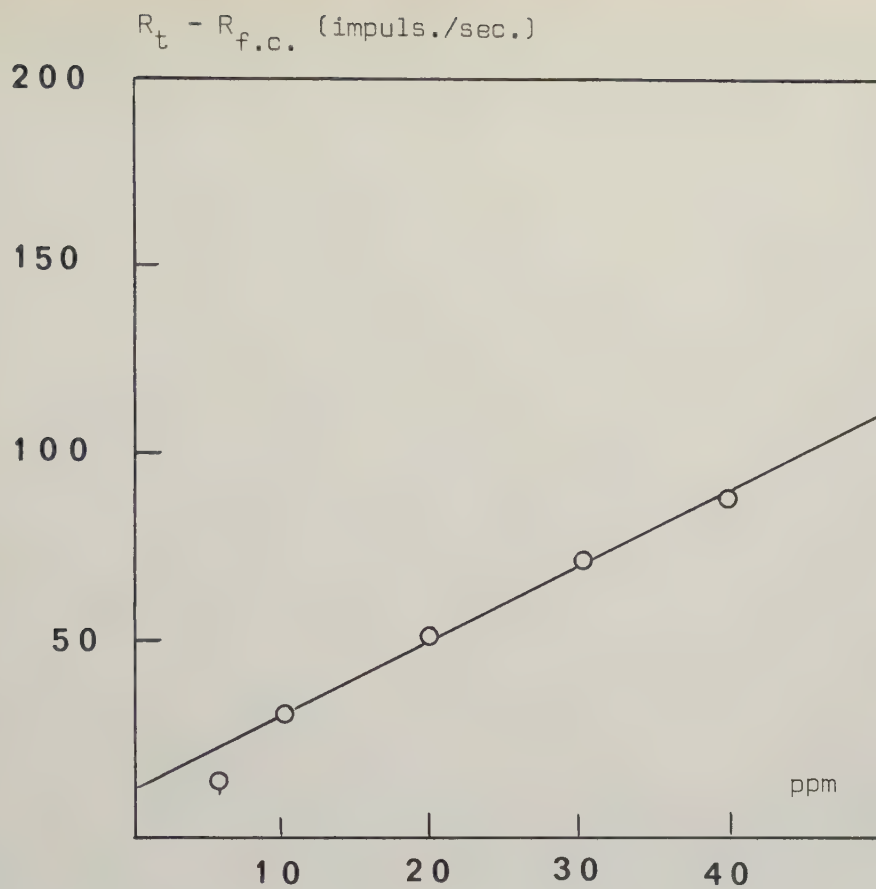


Figure n° 11
Dosage du manganèse
dans le poumon

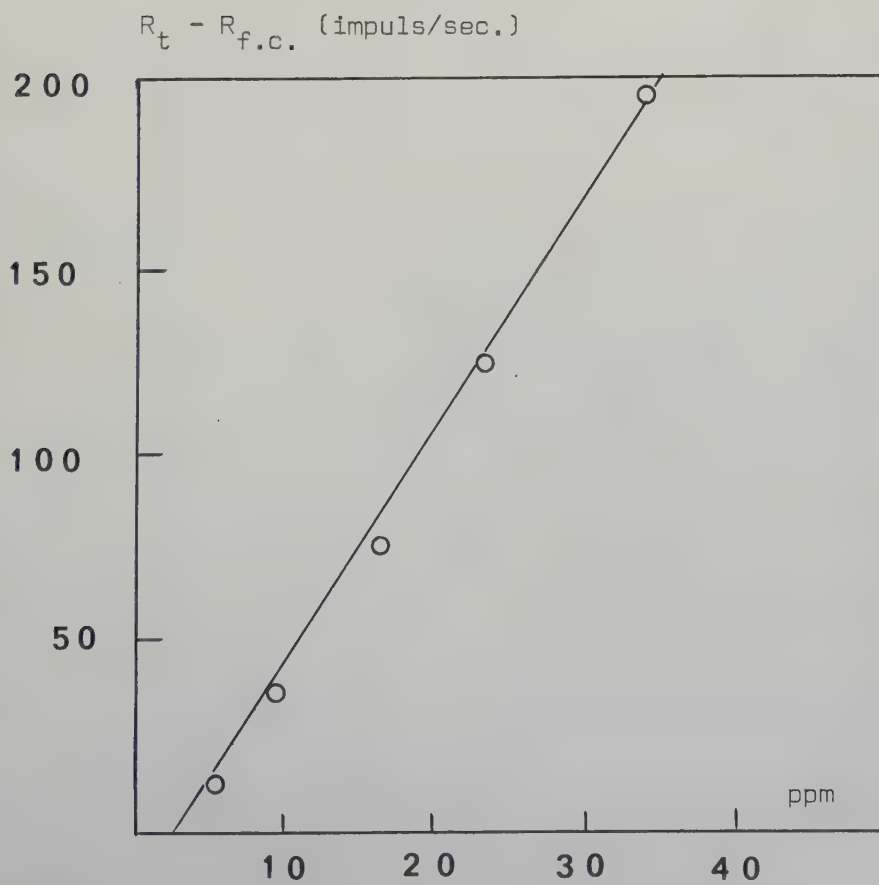


Figure n° 12
Dosage du bismuth
dans le foie

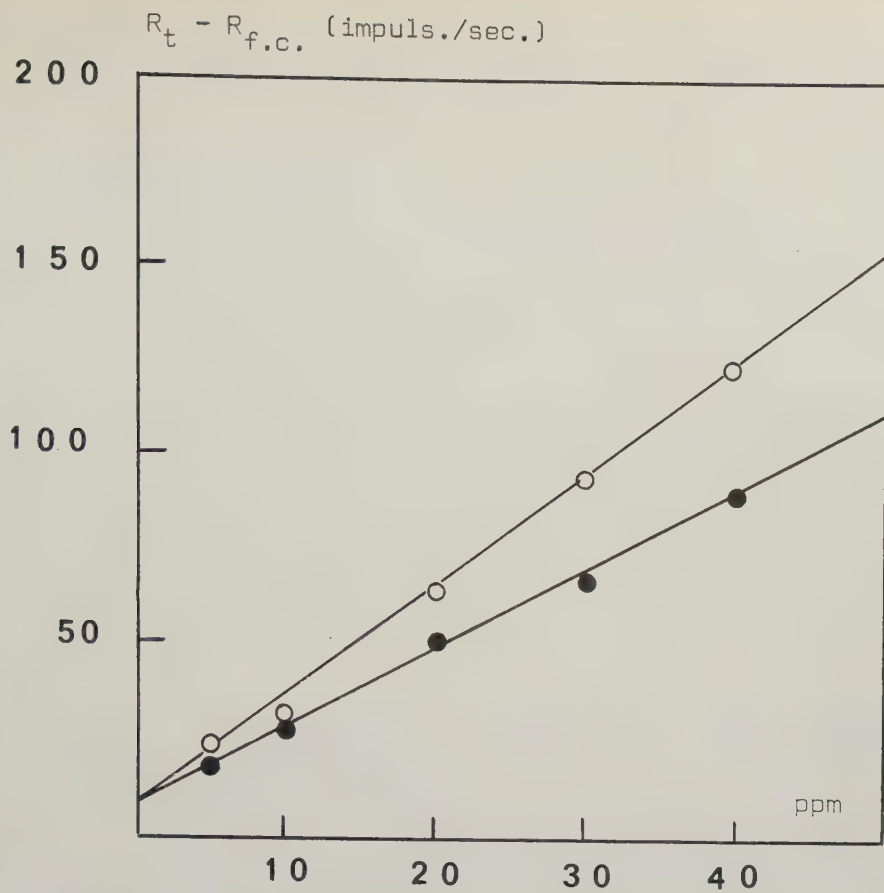
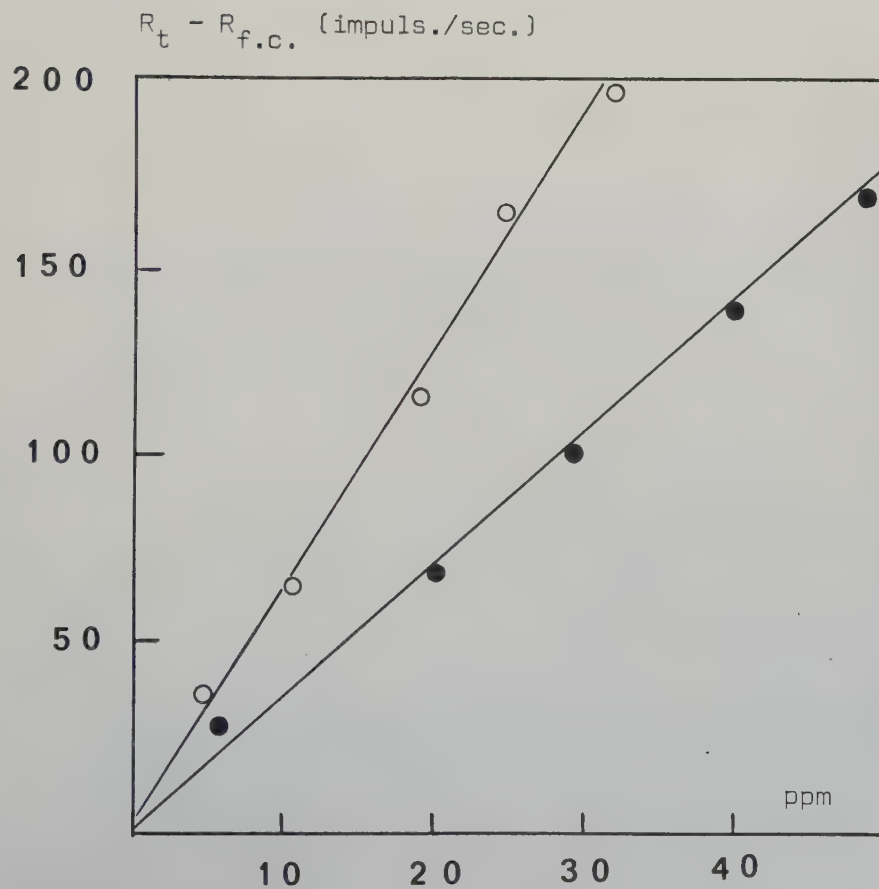


Figure n° 13



ganes :

- l'arsenic dans le foie,
- le thallium dans le foie et le rein,
- le bismuth dans le foie,
- le plomb dans le foie, le rein, le poumon et le sang,
- le selenium dans le foie et le rein,
- le manganèse dans le poumon,
- le molybdène dans le poumon.

• Nous avons établi cette liste d'échantillons de référence en nous basant sur les données relatives à la localisation des éléments toxiques au cours des intoxications.

L'arsenic, le thallium, le bismuth, le plomb et le selenium ont tendance à s'accumuler dans le foie. Quelques-uns de ces toxiques se fixent également dans le rein. Lors d'une exposition à des atmosphères polluées par des dérivés du plomb, du manganèse ou du molybdène, ces toxiques s'accumulent dans le tissu pulmonaire.

d - Discussion de la méthode

Pour mettre au point cette méthode de dosage, nous avons dû procéder à l'étude d'un certain nombre de paramètres, liés à la structure des pastilles de poudre d'organes desséchés et paraissant susceptibles d'avoir une incidence sur la fluorescence X des éléments recherchés : l'épaisseur des pastilles, leur taux de compression, le tamisage de la poudre et l'homogénéité des échantillons.

- Influence du poids de la pastille

Par suite des phénomènes d'absorption, l'énergie des radiations excitatrices décroît au fur et à mesure que celles-ci pénètrent dans l'échantillon ; de la même manière, l'énergie du rayonnement de fluorescence X est absorbée par les atomes qu'il rencontre sur son trajet. Pour ces deux raisons, l'intensité du rayonnement de fluorescence X est d'autant plus atténuée que les atomes qui l'émettent sont situés plus profondément vers l'intérieur de l'échantillon. Le phénomène de fluorescence X ne concerne donc qu'une zone superficielle des échantillons analysés et au-delà d'une certaine valeur, dite épaisseur critique, l'épaisseur de la pastille n'a plus d'influence sur ce phénomène.

Comme les pastilles préparées avec le moule que nous utilisons sont des cylindres qui ont tous le même diamètre, nous pouvons considérer que leur épaisseur est déterminée par leur volume, donc par le poids de poudre qui a servi à les confectionner. Nous avons ainsi été amenés à étudier l'influence du poids de la pastille sur l'intensité de la fluorescence X. Nous avons opéré sur des échantillons de poudre de sang desséché renfermant 33 ppm de plomb (tissu frais), avec laquelle nous avons préparé une série de pastilles pesant de 300 à 1 500 mg et comprimés sous 80 kg/cm².

Le calcul du test t pour les différentes valeurs trouvées (tableau n° 6) montre que la fluorescence X de la pastille préparée avec 300 mg de poudre est la seule à présenter une diminution statistiquement significative par rapport à la valeur suivante et que la fluorescence X reste pratiquement constante, aux erreurs de comptage près, quand les pastilles sont préparées avec plus de 400 mg de poudre.

On peut donc admettre qu'un poids de poudre de tissu desséché égal à 400 mg correspond à l'épaisseur critique et qu'au-delà de cette valeur, le poids de la pastille n'a plus d'incidence sur l'intensité des fluorescences X qu'elle émet, à la condition, bien entendu, que la poudre soit homogène. Ce résultat nous a incité à utiliser pour la suite de nos travaux des pastilles de poudres d'organes d'un poids de 500 mg.

- Influence du taux de compression de la pastille

Le second facteur qui conditionne l'épaisseur de la pastille est le taux de compression utilisé pour sa préparation.

Nous avons recherché l'influence de ce facteur sur l'intensité de la fluorescence X en opérant sur un échantillon de sang desséché renfermant 33 ppm. de plomb (tissu frais). Nous avons préparé quatre séries de pastilles en appliquant des taux de compression respectivement égaux à 40, 60, 80 et 100 kg/cm².

Aux erreurs de comptage près, les intensités de la fluorescence X mesurées sont identiques (tableau n° 7). Il apparaît donc que, dans les limites étudiées, le taux de compression des pastilles n'a pas d'incidence sur la fluorescence X.

- Influence du tamisage de la poudre

Quelques travaux, notamment ceux de CLAISSE et SAMSON (22), ont montré que la granulométrie de l'échantillon analysé influe sur la mesure de la fluorescence X, lorsque les éléments à doser sont dispersés dans une matrice minérale.

Poids de la pastille - mg -	Intensité de la Fluorescence X Pb $L\beta_1\beta_2$ (14,15°) R_t - imp./sec. -	$R_t \pm 2,6 \sqrt{\frac{R_t}{t}}$ Prob. 99 p.100
300	652	$652 \pm 6,6$
400	669	$669 \pm 6,7$
500	668	$668 \pm 6,7$
600	671	$671 \pm 6,7$
800	673	$673 \pm 6,7$
1000	670	$670 \pm 6,7$
1500	669	$669 \pm 6,7$

TABLEAU n°6 - Influence du poids de la pastille
sur l'intensité de la fluorescence X

Taux de compression - kg/cm² -	Intensité de la fluorescence X Pb L$\beta_1\beta_2$ (14,15°) (R) imp./sec.
40	372
60	371
80	369
100	370

TABLEAU n°7 - Influence du taux de compression des pastilles
sur l'intensité de la fluorescence X

Nous avons recherché si le même phénomène intervient lorsque la matrice est composée en majeure partie de substances organiques. Dans ce but, nous avons examiné l'influence que peut avoir le tamisage des poudres d'organes sur les fluorescences X qu'elles émettent. Pour cela, nous avons comparé l'intensité de la raie $L\beta_{1,2}$ du plomb pour deux séries de pastilles préparées avec les mêmes échantillons de poudre de foie, mais différant l'une de l'autre par le fait que, dans l'une, la poudre a subi un tamisage à travers un tamis module 22. Nous avons opéré avec trois concentrations en plomb (10, 30 et 40 ppm. dans le tissu frais) et pour chaque concentration, nous avons préparé dix pastilles de poudre non tamisée et dix pastilles de poudre tamisée.

D'après les résultats indiqués dans le tableau n° 8, le tamisage de la poudre ne paraît pas modifier l'intensité de la fluorescence X. Les moyennes des mesures après tamisage paraissent toujours légèrement supérieures à celles obtenues avec une poudre non tamisée, mais la comparaison statistique de ces moyennes à l'aide du test t montre que les différences ne sont pas significatives.

A la lumière de ces résultats, le tamisage de la poudre semble donc être une opération superflue.

- Homogénéité de la composition des pastilles

Si la couche superficielle de la pastille exposée au flux de radiations excitatrices présente une composition homogène, l'intensité de la fluorescence X émise par un élément doit être indépendante de l'orientation de la pastille par rapport au faisceau incident.

C'est ce que nous avons cherché à vérifier en effectuant plusieurs séries de mesures sur des pastilles d'organes desséchés, dont nous faisons varier l'orientation. Nous avons opéré sur des pastilles de foie d'un poids de 500 mg et contenant 10,30 ou 40 ppm de plomb, dont nous avons mesuré l'intensité des raies $L\beta_{1,2}$. Entre chaque mesure, nous avons fait tourner les pastilles d'un angle de 36° environ.

Les résultats de ces essais sont indiqués dans le tableau n° 9. A partir des valeurs obtenues, nous avons calculé la dispersion autour de la moyenne due à l'hétérogénéité des pastilles et celle due au comptage. Ces dispersions sont extrêmement voisines : celle due au comptage est de ± 1 p.100 et celles provenant de l'hétérogénéité des pastilles vont de $\pm 1,2$ à ± 2 p.100. Elles peuvent donc être tenues pour identiques.

Nous pouvons donc considérer que les pastilles de poudre d'organes desséchés, préparées selon le mode opératoire que nous avons indiqué, ont

Concentrations en plomb (tissu frais) - ppm -	10		30		40	
	poudre non tamisée	poudre tamisée	poudre non tamisée	poudre tamisée	poudre non tamisée	poudre tamisée
Fluorescence X mesurée sur 10 pastilles raies $L\beta_1\beta_2$ Pb (14,15°) (R) - imp./sec. -	599	609	643	650	653	667
	597	613	635	652	658	658
	602	619	638	654	659	665
	605	617	643	649	654	669
	599	614	644	651	653	662
	599	616	646	648	654	661
	601	610	647	648	652	667
	601	608	645	651	655	665
	604	603	649	652	654	665
	603	608	643	647	654	667
$\bar{R}$	601	611	643	650	655	665
s^2	6,22	23,77	17,22	4,88	5,11	11,33
t	1,78		1,48		2,46	
t théorique probab. 99 p.100	2,88		2,88		2,88	

TABLEAU n° 8 - Influence du tamisage de la poudre sur l'intensité de la fluorescence X

Concentration en plomb (tissu frais) - ppm -	10	30	40
Fluorescence X	599	643	653
mesurée pour	597	635	659
10 orientations	602	638	659
	605	644	654
de pastilles	599	644	654
(rotation de 36°)	599	647	655
raies $L\beta_1\beta_2$ Pb (14,15°)	601	647	653
R	601	645	655
	604	643	654
- imp./sec. -	603	643	654
$\bar{R}$	601	643	655
S	2,52	3,72	2,18
Dispersion dūe à l'hétérogénéité			
$\bar{R} \pm \frac{3,3 S}{\bar{R}} \times 100$	$601 \pm 1,5 \text{ p.100}$	$643 \pm 2 \text{ p.100}$	$655 \pm 1,2 \text{ p.100}$
Prob. 99 p.100			
Dispersion dūe au comptage			
$\bar{R} \pm \frac{2,6 \sqrt{\frac{\bar{R}}{t}}}{\bar{R}} \times 100$	$601 \pm 1 \text{ p.100}$	$643 \pm 1 \text{ p.100}$	$655 \pm 1 \text{ p.100}$
Prob. 99 p.100			

TABLEAU n° 9 - Dosage des toxiques dans les poudres d'organes desséchés
Contrôle de l'homogénéité des pastilles

une composition homogène et que, par conséquent, le résultat de la mesure de la fluorescence X est indépendant de l'orientation des pastilles par rapport au faisceau de radiations excitatrices.

- Mode d'expression de la fluorescence des éléments recherchés

Dans la deuxième partie, au paragraphe IV nous avons déjà insisté sur la nécessité de corriger la fluorescence mesurée (R_t) en fonction de la fluorescence de base représentée par les rayonnements parasites qui dépendent de la nature de l'échantillon analysé.

Cette correction doit être effectuée en retranchant de l'intensité totale, celle du fond spectral à l'angle θ considéré. Nous avons dit que deux modes de détermination peuvent être envisagés pour établir la valeur du fond spectral :

- le mesurer sur un échantillon "blanc" ne différant de celui analysé que par l'absence du toxique recherché (R_b),

- le calculer à partir des intensités mesurées à des angles situés de part et d'autre de l'angle correspondant à la raie mesurée ($R_{f.c.}$)

La première méthode a le mérite d'être plus rapide et aussi plus précise, puisque la fluorescence propre à l'élément recherché (R_x) est calculée à partir de deux mesures :

$$R_x = R_t - R_b$$

Mais, pourqu'elle soit utilisable, dans le cas des tissus biologiques, il faut que tous les échantillons analogues, c'est-à-dire provenant du même type d'organe, prélevé sur la même espèce animale, fournissent des fluorescences de base identiques, quelle que soit leur provenance. Afin d'étudier cette hypothèse, nous avons récolté six fragments de foie de porc et six fragments de rein de porc de provenances différentes. Avec ces échantillons, nous avons préparé des pastilles, sur lesquelles nous avons mesuré la fluorescence de base aux angles correspondant aux raies de trois toxiques, le plomb ($L\beta_1\beta_2 - 14,15^\circ$), le thallium ($L\alpha_1 - 17,48^\circ$) et le selenium ($K\alpha_1 - 15,95^\circ$).

Les résultats de ces essais sont indiqués dans le tableau n° 10. Nous avons, là encore, comparé la dispersion des mesures provenant de l'échantillonnage avec celle dûe au comptage.

Eléments	Plomb		Thallium		Selenium	
Raies mesurées	$L\beta_1\beta_2$ (14,15°)		$L\alpha_1$ (17,48°)		$K\alpha_1$ (15,95°)	
Organes	Foie	Rein	Foie	Rein	Foie	Rein
Impulsions par seconde (R)	351	341	149	143	180	186
	362	341	152	142	195	186
	365	340	153	139	190	186
	370	342	149	142	190	187
	357	342	143	137	190	183
	377	348	157	144	199	197
$\bar{R}$	364	342	150	141	191	187
S	9,18	3,67	9,18	2,45	16,53	9,80
Dispersion due à la sensibilité du compteur						
$\bar{R} \pm \frac{4 \cdot S}{\bar{R}} \times 100$	$364 \pm 10 \text{ p.100}$	$342 \pm 4,3 \text{ p.100}$	$150 \pm 24,5 \text{ p.100}$	$141 \pm 6,9 \text{ p.100}$	$191 \pm 34,6 \text{ p.100}$	$187 \pm 21 \text{ p.100}$
Prob. 99 p. 100						
Dispersion due au comptage						
$\bar{R} \pm 2,6 \frac{\sqrt{\bar{R}}}{\bar{R}} \times 100$	$364 \pm 1,4 \text{ p.100}$	$342 \pm 1,5 \text{ p.100}$	$150 \pm 2,1 \text{ p.100}$	$141 \pm 2,1 \text{ p.100}$	$191 \pm 2,0 \text{ p.100}$	$187 \pm 2,1 \text{ p.100}$
Prob. 99 p. 100						

TABLEAU n°10 - Dosage des toxiques dans les poudres de tissus desséchés
par la méthode des étalons externes

Variations de la fluorescence de base
en fonction de la provenance des échantillons

Dans tous les cas examinés, la dispersion résultant de l'échantillon est toujours très supérieure à la dispersion due au comptage. Par conséquent, il faut admettre que les divers échantillons de foie ou de rein de porc de provenances différentes possèdent le plus souvent des fluorescences de base qui ne sont pas identiques. Utiliser l'un de ces échantillons comme "blanc" pour doser les éléments d'un autre échantillon introduirait une source d'erreur qui risquerait d'être très importante.

Cette expérience montre que la fluorescence X émise par l'élément à doser ne peut pas être corrigée d'une manière valable en retranchant la fluorescence de base mesurée sur un échantillon "blanc", même si ce dernier provient d'un tissu biologique analogue.

De ce fait, nous sommes contraints d'utiliser le second mode d'expression envisagé, c'est-à-dire, de retrancher de la valeur mesurée celle du fond spectral, déterminée à partir du fond continu, bien que cette méthode qui comporte trois mesures, soit moins précise et plus longue à exécuter.

- Evaluation de la qualité
de la méthode

- Sensibilité et limite de détection

A partir des mesures qui ont servi à établir les courbes de référence, nous avons calculé la sensibilité des dosages et les limites de détection pour chacun des toxiques dans chaque tissu analysé. Ces données sont rassemblées dans le tableau n° 11. Nous avons également fait figurer dans ce tableau les angles de mesure et ceux qui ont servi à la détermination des fonds continus.

Les meilleures sensibilités sont obtenues pour le selenium dans le foie et dans le rein, pour l'arsenic dans le foie et pour le molybdène dans le poumon. Par contre, les sensibilités sont faibles pour le bismuth dans le foie et le manganèse dans le poumon.

En ce qui concerne les limites de détection, trois sont inférieures à 1 ppm de tissu frais : celles du plomb dans le sang, de l'arsenic dans le foie et du selenium dans le rein ; quatre sont de l'ordre de 1 ppm : celles du plomb dans le poumon, du thallium dans le rein, du selenium dans le foie et du manganèse dans le poumon. La limite de détection la plus élevée est celle du bismuth dans le foie qui atteint 6 ppm de tissu frais.

Toxique	Tissu analysé	Angles de mesure			Sensibilité imp./sec./ppm		Limite de détection - ppm -	
		pic	fond					
			θ_x°	θ_1°	θ_2°	tissu sec	tissu frais	tissu sec
Plomb	Foie	14,15	13,90	14,40	0,9	3,7	11,0	3,7
	Rein	14,15	13,90	14,40	0,7	3,0	17,5	3,8
	Poumon	14,15	13,90	14,40	1,0	4,6	6,0	1,3
	Sang	14,15	13,90	14,40	0,8	5,0	2,7	0,4
Arsenic	Foie	17,04	16,80	17,40	2,0	6,2	1,5	0,5
Thallium	Foie	17,48	17,20	17,80	1,0	4,0	4,5	1,2
	Rein	17,48	17,20	17,80	0,9	4,0	8,6	2,0
Selenium	Foie	15,95	15,70	16,50	2,0	7,0	5,2	1,5
	Rein	15,95	15,70	16,50	2,8	13,0	3,6	0,8
Bismuth	Foie	16,53	16,20	16,90	0,5	1,6	19,0	6,0
Manganèse	Poumon	31,55	31,20	32,00	0,2	1,3	7,0	1,3
Molybdène	Poumon	10,25	9,90	10,50	1,2	6,0	13,0	2,6

TABLEAU n° 11 - Dosage des toxiques dans les poudres de tissus desséchés

- méthode des étalons externes -

Sensibilités et limites de détection

- Justesse et répétabilité

Afin d'évaluer la justesse et la répétabilité des résultats obtenus par cette méthode, nous avons préparé plusieurs séries d'échantillons en ajoutant à de la poudre de foie de cheval desséchée des quantités connues de quatre toxiques : plomb, arsenic, thallium et selenium.

Les doses ajoutées ont été choisies de manière à pouvoir obtenir des concentrations de toxiques qui, exprimées par rapport au poids de tissu frais, sont égales à :

- 10 et 19 ppm pour le plomb,
- 20 et 40 ppm pour l'arsenic,
- 5 et 20 ppm pour le thallium,
- 20 et 40 ppm pour le selenium.

Ces taux de toxiques ont été choisis en fonction des indications que nous avons relevées dans des communications de médecine légale relatives à des intoxications mortelles.

Les résultats réunis dans le tableau n° 12 indiquent que l'écart de confiance calculé avec une probabilité de 95 p.100, varie selon les toxiques et selon les milieux analysés : pour six essais sur huit, l'écart de confiance est inférieur à ± 5 p.100 ; dans les deux autres essais, il atteint 10 à 10,9 p.100. La répétabilité de la méthode peut donc être considérée comme satisfaisante. D'autre part, la justesse paraît également bonne, puisque la concentration théorique en toxique est toujours comprise entre les limites de l'écart de confiance, à l'exception d'un dosage de thallium dans le foie pour une dose de 20 ppm, dans lequel la concentration théorique est supérieure à la limite de l'écart de confiance, ce qui traduit une erreur par défaut systématique. A notre avis, cette erreur peut provenir d'une préparation défectueuse de l'échantillon de référence.

Observation -

Nous avons tenté de préparer des pastilles avec les résidus obtenus par évaporation d'échantillons d'urine. Mais ces essais se sont soldés par un échec, car l'urine laisse après dessiccation un résidu pâteux, très hygroscopique, qui adhère au moule et ne se prête pas à la confection de pastilles.

Elément dosé	Plomb		Arsenic		Thallium		Selenium
Organe	Foie de cheval		Foie de cheval		Foie de cheval		Foie de cheval
Concentration théorique Tissu frais - ppm -	10	19	20	40	5	20	20 40
Concentrations trouvées (x) - ppm -	9,2	17,0	20,0	40,7	5,0	18,2	19,8 40,1
	10,2	15,6	19,7	41,6	5,5	18,5	20,2 41,2
	9,2	20,4	19,7	41,3	5,5	18,2	20,4 40,8
	10,2	17,0	19,6	41,3	4,3	18,2	19,6 40,3
	10,2	17,0	20,4	40,4	5,0	17,9	20,2 40,8
	10,2	19,7	19,3	40,1	4,6	18,2	40,1
$\bar{x}$	9,6	17,8	19,6	40,9	5,0	18,2	20,0 40,5
s_m	0,20	0,75	0,25	0,24	0,19	0,07	0,14 0,18
Ecart de confiance Probab. 95 p.100	+ 5 - p.100	+ 10,9 - p.100	+ 0,3 - p.100	+ 1,5 - p.100	+ 10 - p.100	+ 1 - p.100	+ 2 - p.100 + 1,6 - p.100

TABLEAU n°12- Dosage des toxiques dans les poudres de tissus desséchés

- méthode des étalons externes -

Evaluation de la justesse et de la répétabilité

2 - Toxiques minéraux dont les taux physiologiques sont supérieurs aux seuils de détection de la méthode d'analyse

L'emploi de la méthode de dosage avec étalons externes que nous venons d'exposer, suppose qu'il est possible de disposer pour préparer la gamme de référence d'un échantillon identique à celui analysé, mais qui ne contient pas le toxique recherché ou qui le contient à une concentration tenue pour négligeable parce qu'elle est inférieure à la limite de détection de la méthode d'analyse.

Telle qu'elle a été décrite, la méthode avec étalons externes n'est donc pas applicable au dosage d'un certain nombre d'éléments relativement peu toxiques, comme le cuivre et le zinc, normalement présents dans les milieux biologiques à des concentrations appréciables. Mais elle devient utilisable, si l'on modifie légèrement le mode de préparation de la gamme de référence. Celle-ci n'est plus préparée à partir d'un échantillon exempt des toxiques recherchés, mais d'un échantillon étalon dont on connaît exactement les teneurs en ces toxiques. Un tel étalon est relativement facile à obtenir. Il suffit de doser les toxiques en cause dans un échantillon de poudre sèche et homogène, au moyen des méthodes physico-chimiques habituelles et après minéralisation.

Partant de ce principe, nous avons envisagé la possibilité d'employer deux types de méthodes.

La première consiste à mesurer la fluorescence X des éléments à doser sur des pastilles de 500 mg, préparées avec la poudre obtenue par dessiccation et pulvérisation du milieu biologique. Les échantillons de référence sont constitués par des pastilles de milieu étalon, auxquelles on ajoute des surcharges de toxiques.

D'autre part, étant donné les taux relativement élevés des toxiques de cette catégorie dans les milieux biologiques, il semble possible d'utiliser une micro-méthode qui permette d'effectuer les dosages sur des prises d'essais beaucoup plus faibles, de l'ordre de quelques dizaines de milligrammes de produit sec. Dans ce cas, les mesures de fluorescence X ne sont plus effectuées sur des pastilles préparées avec le milieu biologique desséché à l'état pur, mais sur des pastilles obtenues en le diluant dans une poudre inerte, telle que la poudre de cellulose. Les pastilles de référence sont alors préparées en diluant l'étalon dans la poudre de cellulose à des concentrations croissantes.

Pour étudier et mettre au point ces deux méthodes, nous avons uti-

lisé des huîtres, mollusques riches en zinc et en cuivre. Cette raison n'est d'ailleurs pas la seule qui nous ait incités à choisir ce milieu un peu particulier. Les huîtres contiennent une forte proportion de chlorures et il nous a paru intéressant de rechercher si la présence d'un taux élevé de sels minéraux dans l'échantillon analysé n'introduit pas des difficultés particulières dans les dosages par spectrométrie de fluorescence X.

A - Méthode de dosage sur la poudre pure

a - Principe

Le mode de préparation des pastilles est analogue à celui décrit dans la méthode précédente : une certaine quantité d'huîtres, pesée avec précision, est broyée dans l'eau distillée ; le broyat est ensuite desséché sous vide phosphorique et le résidu d'évaporation est pulvérisé ; la poudre obtenue est utilisée pour préparer des pastilles sur lesquelles on mesure l'intensité des raies $K\alpha$ du zinc et du cuivre.

La gamme de référence est établie à partir d'un échantillon de poudre d'huîtres desséchées, obtenu dans les mêmes conditions, et dans lequel le zinc et le cuivre ont été dosés après minéralisation, le zinc par polarographie et le cuivre par une méthode spectrométrique basée sur la formation d'un chélate coloré avec l'oxalyldihydrazide-acétaldéhyde (50). Les échantillons de référence sont préparés en incorporant des quantités croissantes de zinc et de cuivre à des pastilles de cette poudre étalon.

b - Mode opératoire

Les huîtres renfermant de 80 à 83 p.100 d'eau, il faut que la prise d'essai pèse au moins 3 grammes pour qu'elle puisse fournir une quantité de poudre sèche supérieure à 500 mg.

Les huîtres sont séparées de leurs coquilles, lavées rapidement à l'eau distillée, puis essorées sur un papier filtre. La prise d'essai est broyée dans le minimum d'eau distillée à l'aide d'un broyeur Ultra-Turrax. Le broyat obtenu est étalé dans une boîte de Pétri en polyéthylène et placé sous vide phosphorique jusqu'à dessiccation complète. Le résidu obtenu, constitué par une pellicule mince et friable, est pesé, puis broyé finement par trituration dans un mortier d'agate. Cinq cents mg de la poudre obtenue sont utilisés pour confectionner une pastille sur laquelle on mesure l'intensité de la raie $K\alpha$ du zinc ($20,92^\circ$) et de la raie $K\alpha$ du cuivre ($22,53^\circ$).

Pour la préparation de ces pastilles, il est nécessaire de suivre une technique particulière, car la poudre d'huîtres onctueuse et légèrement grasse, a tendance à s'infiltrer entre le corps et le fond du moule, au cours de la compression. Il est possible d'éviter cet inconvénient, en disposant au fond du moule un disque de papier Whatman n°1, qui adhère à la pastille. Il suffit ensuite de découper aux ciseaux le papier qui dépasse le tour de la pastille.

c - Préparation de la gamme de référence

Un poids d'huîtres, voisin de 20 g., est traité dans les conditions indiquées dans le mode opératoire. On obtient ainsi un peu plus de 3 g. de poudre sèche, dont on prélève 100 mg pour le dosage du zinc et du cuivre. Le reste de la poudre sert à confectionner cinq pastilles pesant chacune 500 mg.

- Dosage du zinc

Environ 50 mg. de poudre pesés avec précision, sont introduits dans un petit ballon avec 1 ml d'acide nitrique pur. Le ballon est chauffé au bain de sable à 120°, jusqu'à évaporation totale de l'acide. On ajoute deux gouttes d'acide chlorhydrique pur et on évapore à nouveau jusqu'à siccité. Le résidu est repris par 10 ml de la solution recommandée par REED et CUMMINGS (50) ; cette solution renferme de l'acétate d'ammonium (0,1 M) et du thiocyanate de potassium (0,025 M) ; son pH est ajusté à 4,6 par addition ménagée d'acide acétique.

La polarographie est effectuée sur 2 ml de cette solution entre - 0,8 et -1,3 volts (potentiel de demi-vague : -1,03 volts). Un second polarogramme est enregistré après addition d'une surcharge de 50 µg de zinc, sous forme de 0,1 ml d'une solution à 500µg/ml. La quantité de zinc recherchée est calculée en fonction des mesures polarographiques et de la valeur de la surcharge.

- Dosage du cuivre

Environ 50 mg de poudre, exactement pesés, sont chauffés avec 1 ml d'acide nitrique, jusqu'à siccité. Le résidu est repris par 5 ml d'acide sulfurique 0,1 N et le cuivre est dosé sur 2,5 ml de la solution obtenue, suivant le mode opératoire préconisé par CAPELLE (20).

Dans un tube jaugé de 10 ml, on mesure, en agitant après l'addition de chaque réactif :

- liquide de minéralisation	2,5 ml
- solution de citrate d'ammonium à 15 p.100	1 ml
- solution d'acétaldéhyde à 40 p.100	2 ml
- solution d'oxalyldihydrazide à 0,25 p.100	1 ml
- ammoniaque pure	1 ml
- eau distillée q.s.p.	10 ml

Après un délai de 30 minutes, l'absorbance est mesurée à 540 mμ , en cuve de 2 cm, par rapport à un essai à blanc.

La courbe de référence est établie avec 2,5 , 5 , 7 et 10 μg de cuivre.

- Préparation de la gamme de référence

Soient a et b, les taux respectifs de zinc (p.1000) et de cuivre (ppm), trouvés dans la poudre étalon. Aux cinq pastilles de 500 mg préparées avec cette poudre, on ajoute des surcharges croissantes de zinc et de cuivre. On dépose sur les pastilles 0,1 ml de solutions contenant ces métaux à des concentrations convenablement choisies pour qu'elles permettent d'obtenir dans les pastilles des taux de zinc compris entre (a) et (a+4,00) p.1000 et des taux de cuivre allant de (b) à (b+200) ppm suivant les indications portées dans le tableau n° 13.

L'eau est ensuite évaporée en plaçant les pastilles sous vide phosphorique pendant quelques heures. Les pastilles desséchées sont triturées dans un mortier d'agate, jusqu'à obtention de poudres fines et de teintes homogènes. Ces poudres sont comprimées pour confectionner les pastilles qui serviront à mesurer la fluorescence X du zinc et du cuivre. Pour chacun de ces deux éléments, on trace à partir des résultats des mesures, la courbe de référence :

$$R_t = f (C)$$

qui exprime l'intensité de la fluorescence X en fonction de la concentration.

En appliquant la technique qui vient d'être décrite, nous avons établi des courbes de référence en vue du dosage du zinc et du cuivre dans

Numéro	Solution de zinc		Taux de Zinc dans la pastille p.1000	Solution de cuivre		Taux de Cuivre dans la pastille - ppm -
	Concentration Zn - mg/ml -	Volume ajouté - ml -		Concentration Cu -mg/ml -	Volume ajouté - ml -	
0	0	0	a	0	0	b
1	5	0,100	a + 1,00	0,250	0,100	b + 50
2	10	0,100	a + 2,00	0,500	0,100	b + 100
3	15	0,100	a + 3,00	0,750	0,100	b + 150
4	20	0,100	a + 4,00	1,000	0,100	b + 200

a et b : taux de zinc et de cuivre dans la poudre d'huîtres étalon.

TABLEAU n°13- Dosage du zinc et du cuivre dans les huîtres

- Méthode directe -

Préparation de la gamme de référence

des huîtres de Marennes (Crassostrea angulata Lmk).

Le titrage de la poudre desséchée nous a donné les résultats suivants :

taux de zinc (a) = 3,23 p.1000

taux de cuivre (b) = 270 ppm.

Après addition de surcharges croissantes, nous avons obtenu des gammes de référence contenant des taux de zinc allant de 3,23 p.1000 à 7,23 p.1000 et des taux de cuivre compris entre 270 et 470 ppm. Ces gammes ont servi à tracer les courbes de référence qui sont représentées sur la figure n° 15. Il est à noter que la courbe de référence pour le dosage du zinc passe par l'origine, ce qui montre que l'intensité du fond spectral est négligeable par rapport à l'intensité de la fluorescence totale mesurée.

d - Discussion de la méthode

- Influence de la composition de la matrice sur les effets de tiers-éléments.

Nous avons recherché si une gamme de référence établie avec une espèce d'huîtres déterminée peut servir au dosage du zinc et du cuivre dans des huîtres d'une espèce différente. Il paraissait en effet, possible que leur composition en éléments minéraux, variable d'une espèce à l'autre, ait une incidence sur leurs effets de tiers-éléments.

Nous avons donc établi une seconde gamme de référence pour le dosage du zinc avec des huîtres belons (Ostrea edulis L.). Nous avons obtenu une poudre étalon dont le titre en zinc déterminé par la méthode polarographique était égal à 5,30 p.1000. Avec cette poudre, nous avons préparé cinq pastilles de référence qui contenaient du zinc à des taux allant de 5,30 à 9,30 p.1000. La courbe de référence établie à l'aide de ces pastilles est également représentée sur la figure n° 14.

Les deux courbes de référence ont des pentes moyennes qui sont identiques (0,309 et 0,310 imp./sec./p.1000) et elles sont pratiquement confondues dans la zone des concentrations communes. Par conséquent, on peut admettre que, pour des huîtres de provenances différentes, donc ayant des com-

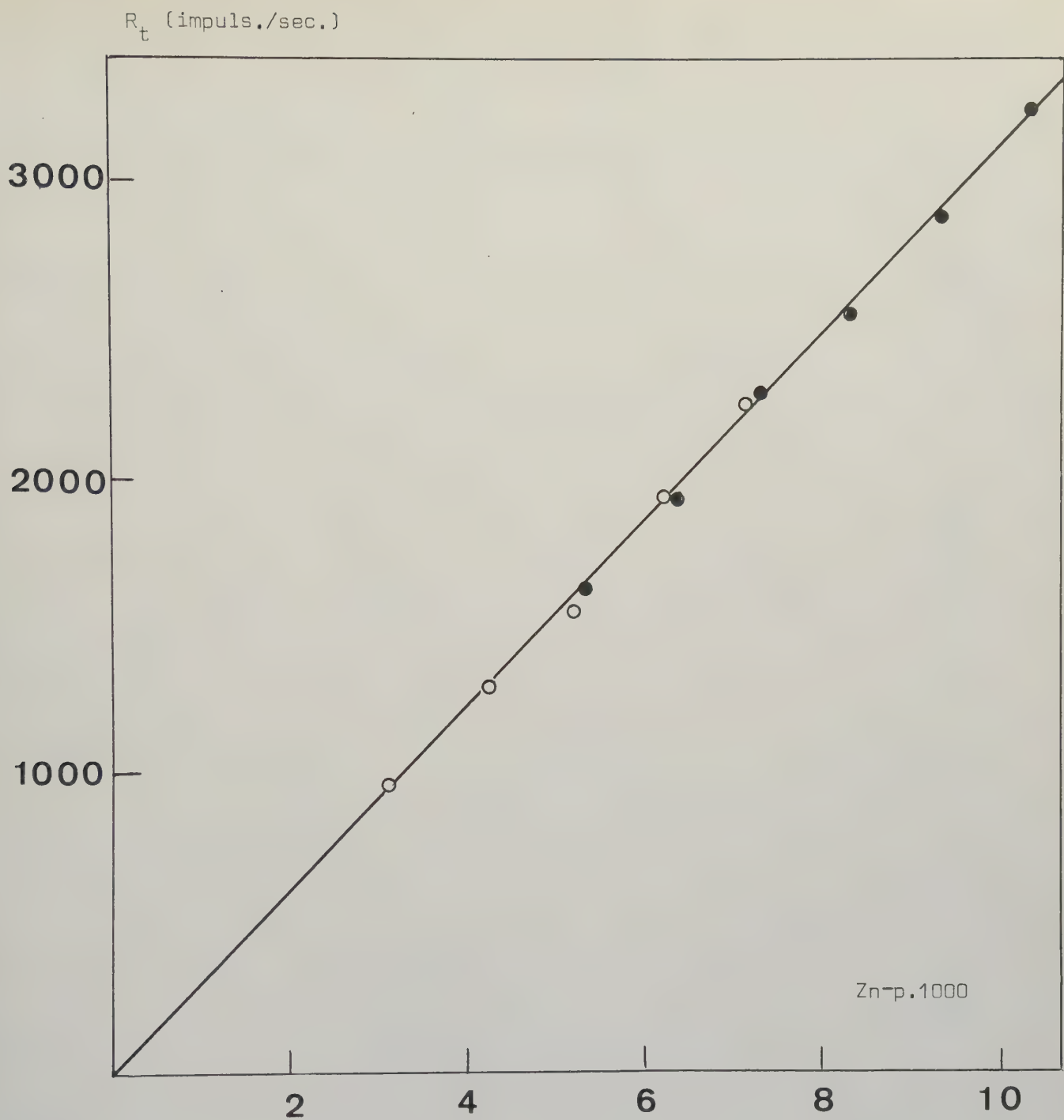


Figure n° 14 - Dosage du zinc dans la poudre d'huîtres desséchées
- méthode directe -

 —  1ère courbe de référence ($a = 3,23 \text{ p.1000}$)
 —  2ème courbe de référence ($a = 5,23 \text{ p.1000}$)

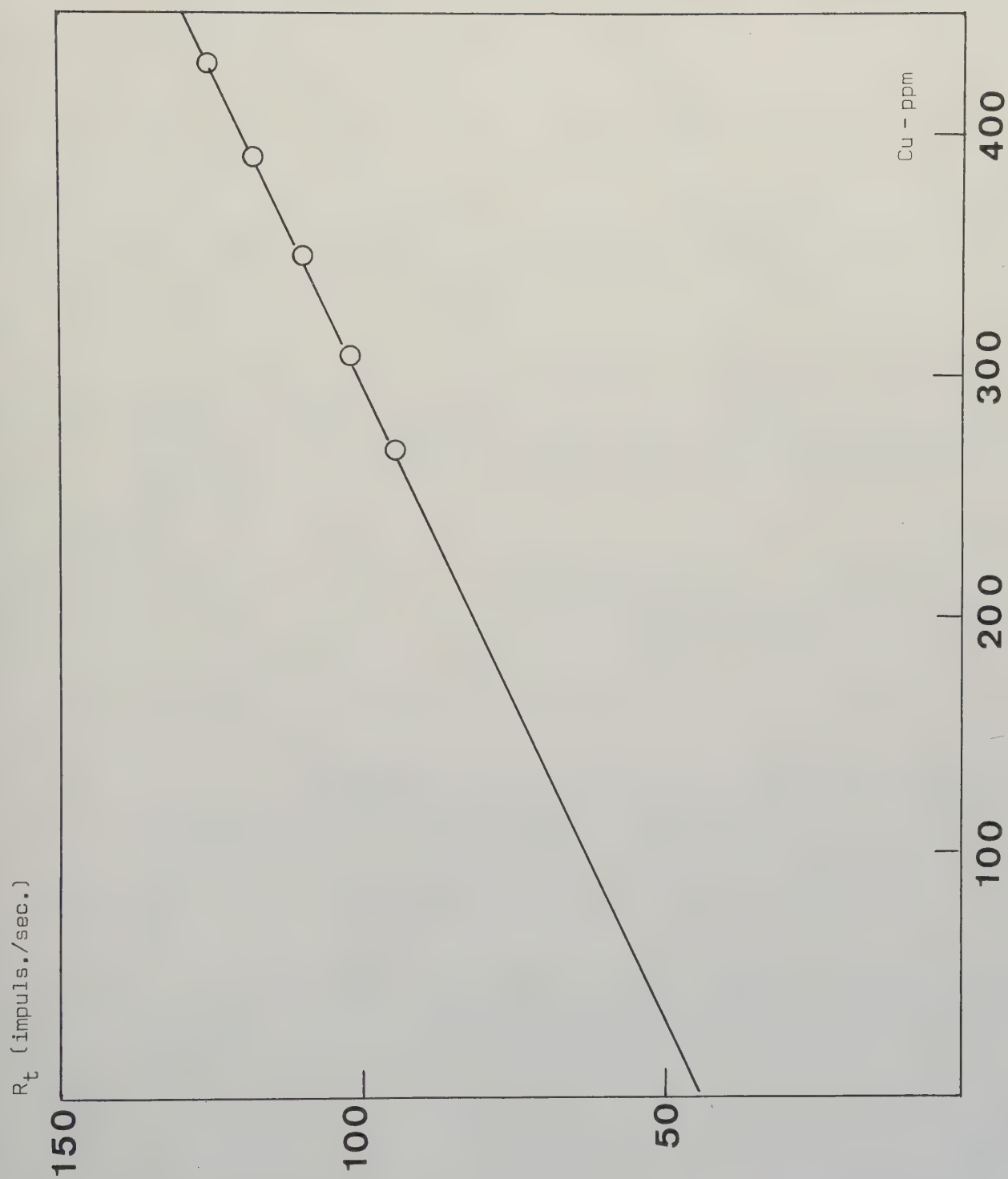


Figure n° 15 - Dosage du cuivre dans la poudre d'huîtres desséchées

- courbe de référence -

positions en éléments minéraux ou organiques différentes, l'effet de tiers-élément reste constant et qu'une gamme de référence établie avec des huîtres d'une certaine espèce peut servir à doser le zinc dans les huîtres des autres espèces.

- Evaluation de la qualité
de la méthode

Pour déterminer la justesse et la répétabilité de la méthode proposée, nous avons utilisé un échantillon de poudre d'huîtres étalon, avec lequel nous avons préparé six pastilles de 500 mg. Sur ces pastilles, nous avons procédé au dosage du zinc et du cuivre.

Les résultats de ces dosages sont réunis dans le tableau n° 14. La moyenne des taux obtenus, tant pour le zinc que pour le cuivre, est identique au taux théorique et l'écart de confiance est égal à $\pm 2,1$ p.100 dans le cas du zinc et 1,4 p.100 dans le cas du cuivre. Ces résultats nous permettent de conclure que la justesse et la répétabilité de la méthode sont très satisfaisantes.

B - Micro-méthode de dosage du zinc par
dilution dans une poudre inerte

a - Principe

Un fragment d'huître est broyé dans quelques ml d'eau distillée et desséché sous vide phosphorique. Le résidu obtenu est pesé, puis pulvérisé au mortier d'agate. Ensuite, 50 mg de cette poudre sont mélangés à 450 mg de poudre de cellulose pure, de manière à obtenir un mélange homogène qui sert à préparer une pastille sur laquelle on mesure la fluorescence X du zinc qui est rapportée directement sur une courbe de référence.

Cette courbe est établie avec des pastilles composées de mélanges de poudre de cellulose pure et de quantités croissantes d'une poudre d'huîtres étalon, dont le titre en zinc a été préalablement déterminé par la méthode polarographique.

b - Mode opératoire

La poudre d'huîtres est préparée selon le procédé exposé dans la méthode précédente. La prise d'essai doit être de 300 mg environ, de manière à ce qu'elle fournisse un peu plus de 50 mg de produit sec.

Elément dosé	Zinc	Cuivre
Concentration * théorique poudre desséchée p.1000	5,30	0,490
Concentrations trouvées (x) p.1000	5,39	0,490
	5,24	0,498
	5,18	0,485
	5,24	0,490
	5,46	0,492
	5,26	0,478
$\bar{x}$	5,30	0,489
s_m	0,0435	0,0227
Ecart de confiance Préb. 95 p. 100	$\pm 2,1$ p.100	$\pm 1,4$ p.100

* Déterminée par les méthodes physico-chimiques

TABEAU n° 14 - Dosage du zinc et du cuivre dans les huîtres

- méthode directe -

Evaluation de la justesse et de la répétabilité

On prélève 50 mg de la poudre obtenue et on les mélange à 450 mg de poudre de cellulose pure "pour chromatographie". Le mélange est trituré au mortier d'agate jusqu'à ce que la poudre présente un aspect homogène, puis il est transformé en une pastille, sur laquelle on mesure la fluorescence de la raie $K\alpha$ du zinc ($20,92^\circ$).

c - Préparation de la gamme de référence

La courbe de référence est établie à l'aide de six pastilles contenant 0, 10, 20, 40, 60 et 80 mg de poudre d'huîtres titrée, auxquels on ajoute des quantités suffisantes de poudre de cellulose pure pour obtenir des pastilles pesant exactement 500 mg. La concentration du zinc dans les pastilles est calculée en fonction du taux de ce métal dans la poudre étalon et de la dilution de cette poudre dans chaque pastille.

Nous avons reproduit sur la figure n° 16 une courbe de référence établie dans ces conditions avec une poudre d'huîtres contenant du zinc au taux de 5,30 p.1000 de poudre.

d - Discussion de la méthode

- Etude de l'effet de matrice dû à la présence de la poudre d'huîtres dans la poudre de cellulose

Pour que la courbe de référence, établie selon la méthode indiquée, soit linéaire, il est nécessaire que l'effet de matrice dû à la présence de la poudre d'huîtres dans la poudre de cellulose soit négligeable. Il est donc à prévoir qu'à partir d'une certaine concentration en poudre d'huîtres, la courbe de référence présentera un point d'inflexion, qui marquera le début de la manifestation de l'effet de matrice.

Nous avons cherché à déterminer la zone de concentrations dans laquelle la courbe de référence reste linéaire. A cette fin, nous avons préparé une série de pastilles contenant des quantités croissantes d'une poudre d'huîtres étalon et des quantités de poudre de cellulose pure suffisantes pour obtenir des pastilles de 500 mg. Sur ces pastilles, nous avons mesuré l'intensité de la raie $K\alpha$ du zinc. A partir des résultats obtenus, qui sont indiqués dans le tableau n° 15, nous avons tracé la courbe représentée sur la figure n° 17, qui exprime cette intensité en fonction de deux paramètres: la teneur des pastilles en zinc et leur concentration en poudre d'huîtres.

La fluorescence X est une fonction linéaire de la concentration en zinc tant que la proportion de poudre d'huîtres dans les pastilles ne dépasse

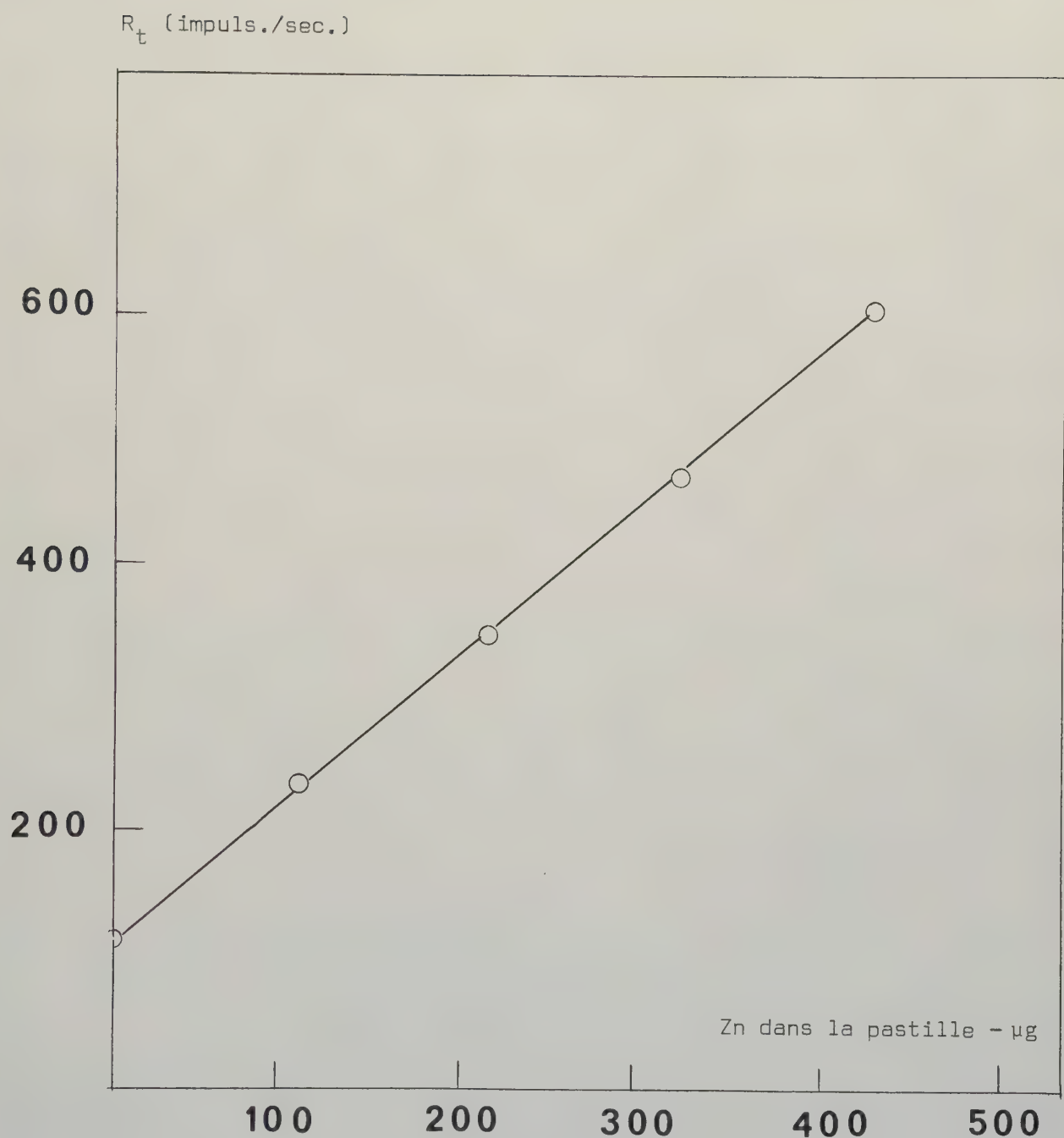


Figure n° 16 - Dosage du zinc dans les huîtres

- microméthode par dilution -
dans la poudre de cellulose

- courbe de référence -

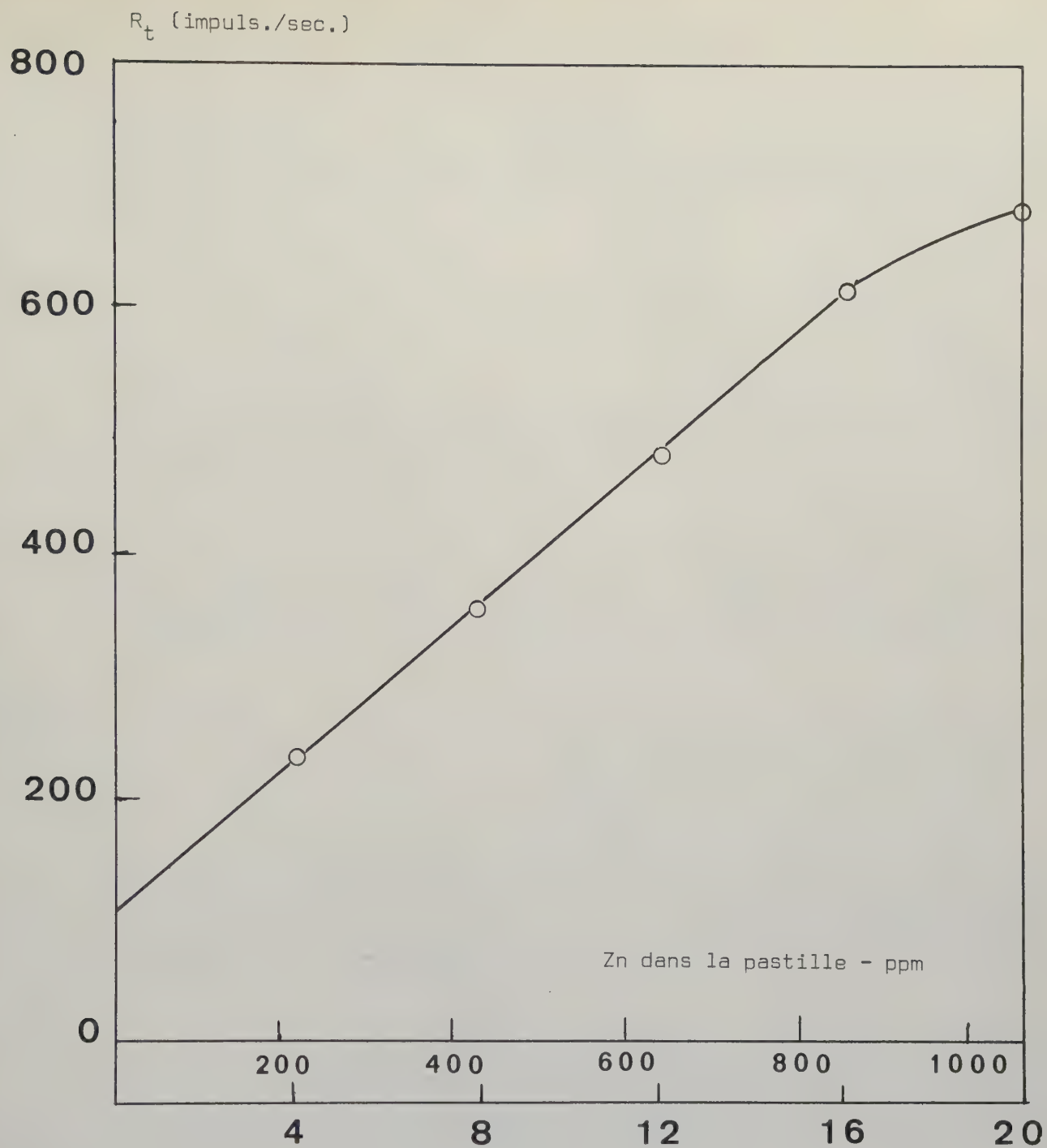
Pastilles n°s	Quantité de poudre d'huile dans une pastille de 500 mg - mg -	Concentration du zinc dans la pastille - ppm -	Fluorescence X imp./sec.
0	0	0	90
1	20	212	233
2	40	424	356
3	60	636	474
4	80	848	626
5	100	1060	676

TABEAU n° 15 - Dosage du zinc dans les huîtres

- micro-méthode par dilution -

Influence de l'effet de matrice

dû à la présence de poudre d'huîtres dans la poudre de cellulose



poudre d'huîtres dans la pastille-p.100

Figure n° 17 - Dosage du zinc dans les huîtres

- microméthode par dilution -
dans la poudre de cellulose

pas 80 mg dans une pastille de 500 mg soit 16 p.100. On peut donc admettre qu'au-dessous de cette valeur, l'effet de matrice résultant de la présence de la poudre d'huîtres dans la poudre de cellulose peut être tenu pour négligeable.

- Evaluation de la justesse et
de la répétabilité de la méthode

Pour évaluer ces deux facteurs, nous avons dosé le zinc dans deux séries de six pastilles obtenues en diluant dans 450 mg de poudre de cellulose pure, 50 mg de deux poudres d'huîtres étalons, titrant respectivement 4,23 et 6,23 p.1000 de zinc.

Les résultats sont indiqués dans le tableau n° 16. Ils montrent que la répétabilité est excellente puisqu'elle est comprise entre 1 et 1,5 p.100. En ce qui concerne la justesse, il faut noter une légère erreur par défaut qui est de 5 p.100 dans un cas et de 3 p.100 dans l'autre.

C - Comparaison de la méthode directe et
de la microméthode par dilution pour
le dosage du zinc dans les huîtres

Nous avons utilisé les deux méthodes que nous avons mises au point pour doser le zinc dans des huîtres de diverses provenances. Nous avons profité de cette occasion pour effectuer une vérification supplémentaire de la validité de ces méthodes en contrôlant les taux de zinc trouvés dans ces échantillons par des dosages polarographiques.

Les résultats de ces essais comparatifs sont réunis dans le tableau n° 17. Si l'on prend la méthode polarographique comme méthode de référence, on constate qu'il existe entre les valeurs qu'elle fournit et celles qui sont obtenues par les méthodes spectrométriques de fluorescence X, des écarts qui atteignent au maximum ± 11 p.100.

D'autre part, les résultats de la méthode directe et ceux de la micro-méthode ne diffèrent pas de ± 5 p.100. On peut donc considérer que les deux méthodes fournissent des résultats qui sont pratiquement identiques.

Les huîtres ont été choisies à titre d'exemple pour étudier des méthodes de dosage du zinc et du cuivre dans les milieux biologiques par spectrométrie de fluorescence X. Mais les méthodes proposées sont applicables à tous les autres milieux qui renferment ces éléments à des concentrations

Elément dosé	zinc	
Concentration théorique Poudre desséchée - p. 1000 -	4,23	6,23
Concentrations trouvées (x) p. 1000	3,90 3,94 3,90 3,99 3,90 3,99	6,04 6,06 6,03 6,13 5,88 6,04
$\bar{x}$	3,93	6,03
s_m	0,018	0,033
Ecart de confiance Probab. 95 p. 100	$\pm 1,2$ p.100	$\pm 1,4$ p.100

TABLEAU n° 16 - Dosage du zinc dans les huîtres

- micro-méthode par dilution -

Evaluation de la justesse et de la répétabilité

Pastilles N ° S	Taux de zinc trouvés dans les huîtres desséchées — p.100 —			Différence par rapport à la méthode polarographique — p.100 —	
	méthode polarographique	méthode directe	micro-méthode par dilution	méthode directe	micro-méthode par dilution
1	4,26	4,01	3,79	- 5,8	- 11,0
2	4,53	4,80	4,59	+ 5,7	+ 1,3
3	5,73	5,39	5,38	- 5,7	- 6,1
4	6,33	6,18	6,55	- 2,3	+ 3,4
5	6,01	5,89	6,12	- 1,9	+ 1,8
6	7,23	7,92	7,97	+ 9,5	+ 10,2

TABLEAU n° 17 - Dosage du zinc dans les huîtres
Comparaison des méthodes de dosage
par fluorescence X et par polarographie

relativement élevées, notamment certains viscères, tels que le foie ou le rein de Mammifères. Suivant la richesse du tissu analysé, il est possible d'adopter la méthode d'analyse directe sur la poudre desséchée ou la micro-méthode par dilution dans une poudre inerte.

II - Analyse des milieux biologiques

après minéralisation et enrichissement

Les recherches qui ont trait à cette partie de notre travail ont été effectuées sur des solutions aqueuses de toxiques minéraux. Nous avons considéré que ces solutions représentent des liquides de minéralisation obtenus par des méthodes qui n'introduisent pas dans le milieu analysé des réactifs susceptibles d'entraver les méthodes d'enrichissement qui seront employées.

Cette hypothèse implique que les méthodes de minéralisation ont été choisies de manière à satisfaire à cette exigence. Après avoir étudié les possibilités de doser par spectrométrie de fluorescence X des toxiques minéraux qui ont été préalablement isolés à l'aide d'un procédé d'enrichissement, nous avons donc été amenés à sélectionner des méthodes de minéralisation qui se montrent compatibles avec ce procédé.

Lorsque l'analyse doit être terminée par une mesure de fluorescence X, le but de l'enrichissement, est d'amener le ou les éléments toxiques sous la forme d'un dépôt homogène, de très faible épaisseur et de dimensions telles qu'il soit inclus en totalité dans le faisceau de radiations excitatrices. La forme qui paraît la plus rationnelle et aussi la plus commode à réaliser est celle d'un disque de 8 mm de diamètre, qui viendra s'inscrire à l'intérieur de la plage irradiée dont les dimensions, dans un spectrodiffractomètre CRISTALLOBLOC 50, sont celles d'un rectangle de 10 x 12 mm.

Pour arriver à ce résultat, nous avons eu recours à deux méthodes d'enrichissement utilisées d'une manière courante en Toxicologie : la précipitation des éléments à l'état de sulfures insolubles ou leur extraction sous la forme de complexes solubles dans les solvants organiques non miscibles à l'eau.

1 - Enrichissement par précipitation à l'état de sulfures insolubles

Cette méthode de dosage est applicable aux toxiques minéraux dont les sulfures ont une très faible solubilité en milieu acide : l'argent, l'arsenic, l'antimoine, le mercure et le bismuth.

A - Principe

Les éléments toxiques contenus dans le liquide de minéralisation sont précipités sous forme de sulfures insolubles par action de la thioacétamide, à chaud, et en milieu sulfurique 2 N, sans addition d'entraîneur. Au préalable, le liquide de minéralisation doit avoir été débarrassé de toute trace de composé oxydant.

Le liquide est ensuite filtré à travers un disque de papier en fibre de verre à haut pouvoir de rétention. Le filtre est séché à l'air, puis analysé par spectrométrie de fluorescence X.

Les éléments recherchés sont dosés en rapportant les valeurs des mesures sur des courbes de référence établies dans des conditions identiques.

B - Matériel

L'isolement des sulfures par ce procédé nécessite l'emploi d'un dispositif de filtration spécial qui est représenté sur la figure n° 18. Ce dispositif permet de concentrer la totalité du précipité à la surface du filtre, sur une plage circulaire de 8 mm. de diamètre.

Il se compose d'un tube entonnoir en verre Pyrex, dont le bord inférieur est constitué par un disque épais à surface rodée. Le diamètre intérieur de la partie terminale de ce tube doit être de $8,0 \pm 0,5$ mm. Il est très important que la section rodée du tube soit parfaitement nette et ne porte aucune ébréchure. Sinon, il est impossible de rassembler le précipité sous la forme d'un dépôt circulaire.

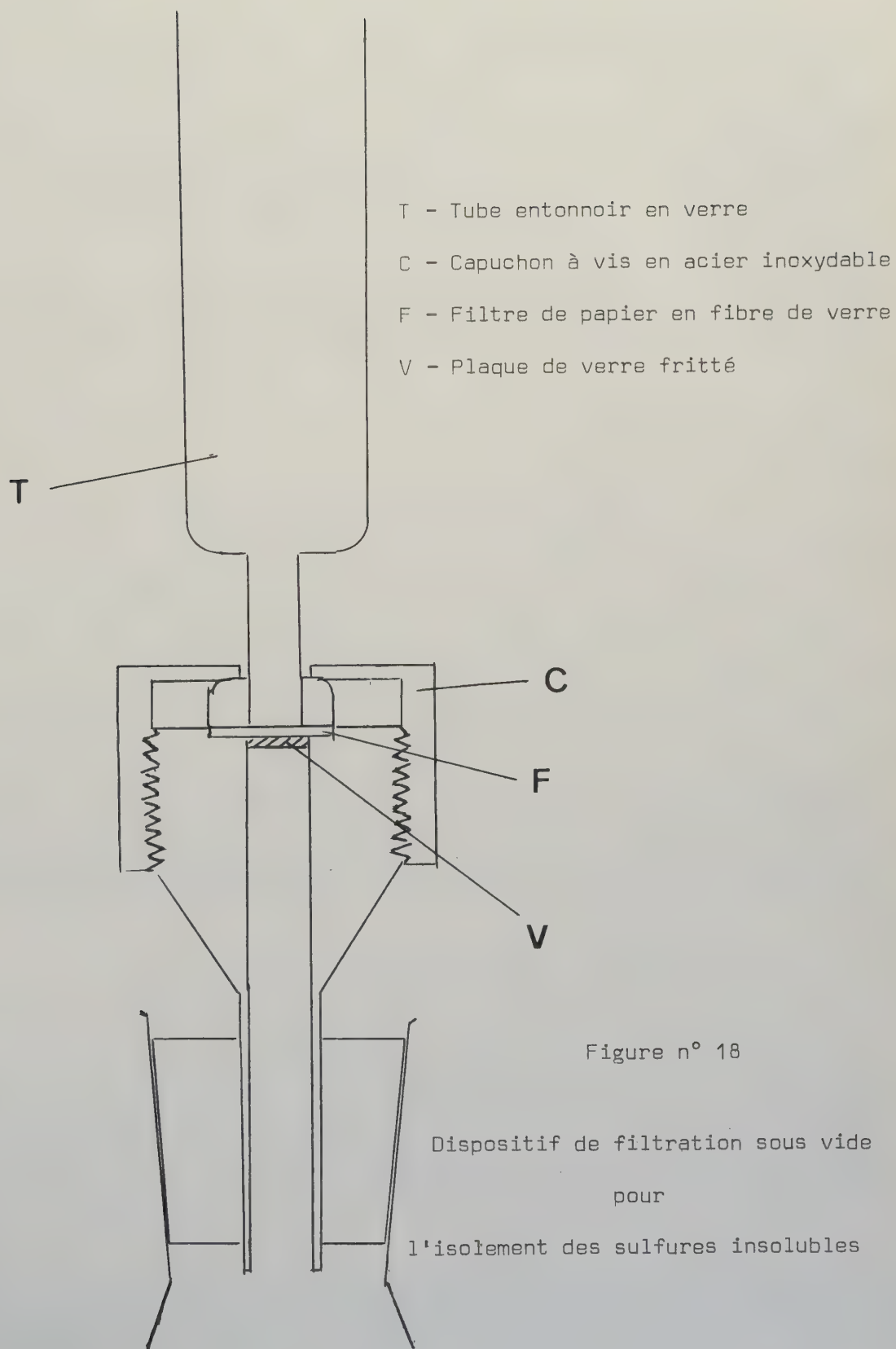
Le tube entonnoir s'adapte sur un support en acier inoxydable, portant un évidement de 1 mm. de profondeur et de 20 mm de diamètre, dans lequel on dépose le disque de papier en fibre de verre. Pour éviter la déformation du filtre sous l'influence de la dépression, le tube d'écoulement est fermé à sa partie supérieure par une pastille de verre fritté.

Le tube entonnoir est maintenu sur le support grâce à un capuchon fileté, qui permet de comprimer fortement le disque de papier en fibre de verre entre le tube entonnoir et le support métallique. Du fait de cette pression, la base du tube entonnoir vient s'incruster légèrement dans ce disque, ce qui assure l'étanchéité du dispositif de filtration et permet d'obtenir un dépôt de sulfures parfaitement délimité.

C - Mode opératoire

Cent ml de liquide de minéralisation, exempts de composés oxydants, sont introduits dans un Erlenmeyer de 150 ml à bouchon rodé et additionnés d'une quantité d'acide sulfurique pur suffisante pour amener le titre de la solution au voisinage de 2N.

On ajoute alors 1 ml d'une solution aqueuse de thioacétamide à 2 p.100, on bouche l'Erlenmeyer et on le porte au bain-marie à 90° pendant 15 minutes.



Après un délai de trois heures, nécessaires pour obtenir la précipitation complète des sulfures, le liquide est filtré à travers un disque de 20 mm de diamètre découpé à l'emporte-pièce dans des filtres de papier en fibre de verre (Whatman G.F/C). L'Erlenmeyer est rincé, à deux reprises, avec 10 ml d'une solution d'acide sulfurique 2 N renfermant 2 p.100 de thioacétamide, qui servent également à laver le tube entonnoir du porte-filtre. Enfin, ce tube est rincé avec 2 ml d'eau distillée pour éliminer l'acide sulfurique et la thioacétamide restant dans le filtre.

Ce dernier est détaché du support avec précaution, car il est assez fragile, puis, déposé sur une plaque de verre sur laquelle on le laisse exposé à l'air pendant 30 minutes environ pour lui permettre de sécher.

Sur ce filtre, on mesure l'intensité de la fluorescence $X (R_t)$ des raies :

$K\alpha$ de l'arsenic ($17,04^\circ$)

$K\alpha$ de l'antimoine ($6,72^\circ$)

$K\alpha$ de l'argent ($8,06^\circ$)

$L\alpha_1$ du bismuth ($16,53^\circ$)

$L\beta_1$ du mercure ($15,12^\circ$)

La fluorescence de base (R_b) est mesurée sur un disque de papier en fibre de verre qui a été préalablement lavé avec la solution sulfurique de thioacétamide, et séché à l'air. Les valeurs de $(R_t - R_b)$ sont reportées sur des courbes de référence établies pour chacun des éléments recherchés.

D - Préparation de la gamme de référence

Pour chacun des toxiques précipitables sous forme de sulfures insolubles (antimoine, arsenic, argent, bismuth et mercure), les courbes de référence sont établies selon les conditions décrites dans le mode opératoire en utilisant 100 ml de solutions renfermant 100, 200, 500, 750 et 1000 $\mu\text{g/l}$ d'élément à doser. A titre d'indications, nous avons reproduit sur les figures n° 19, 20, 21, 22 et 23 les courbes de référence des cinq éléments que nous avons étudiés.

Les échantillons de référence sont pratiquement inaltérables, s'ils sont manipulés avec précaution et conservés séparément dans de petites boîtes

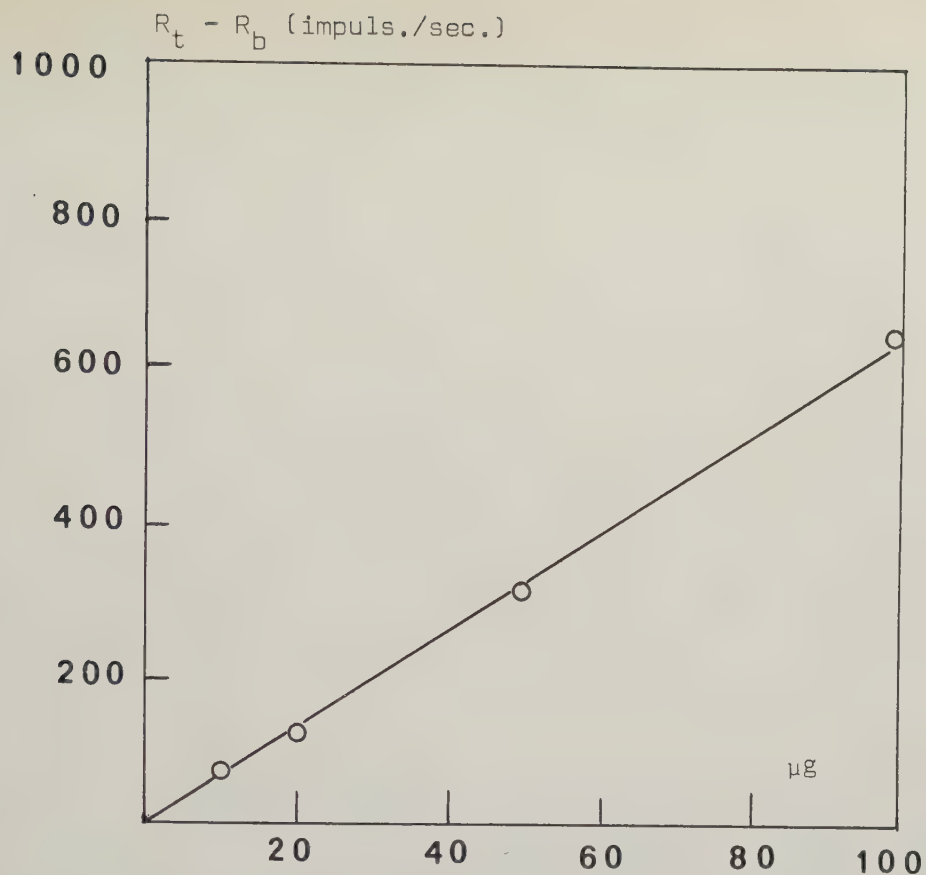


Figure n° 19
Dosage du mercure à
l'état de sulfure

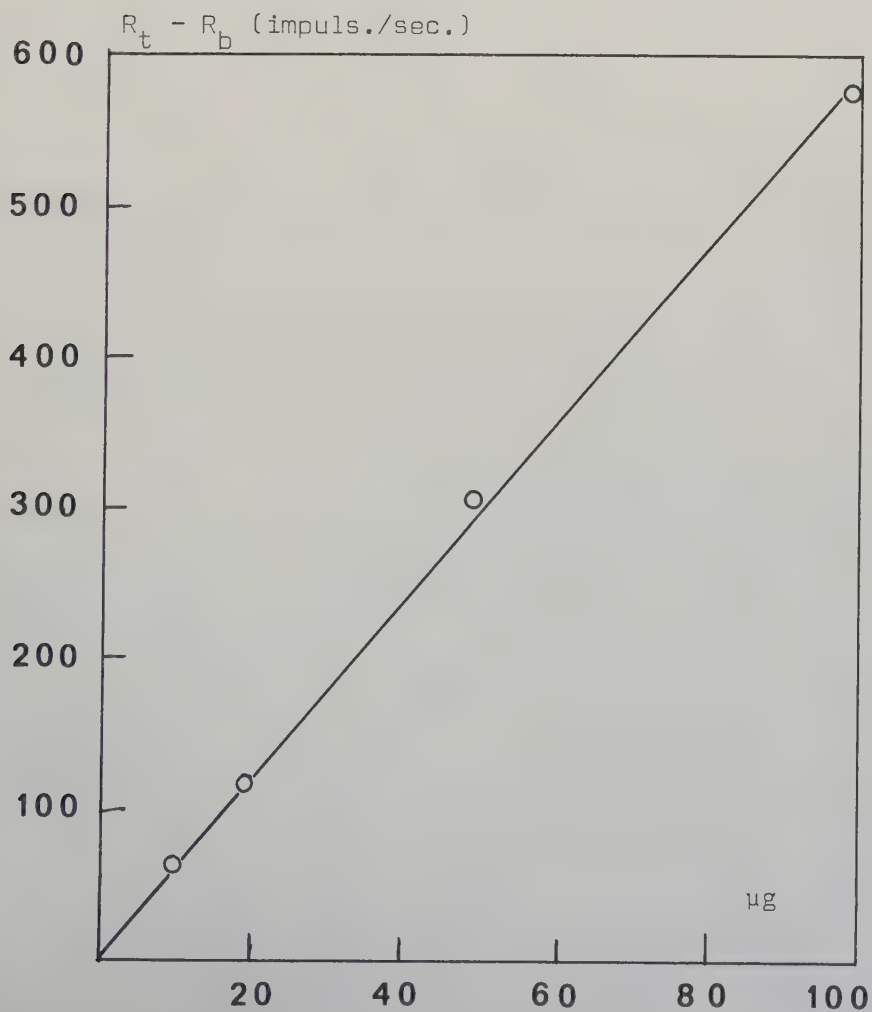


Figure n° 20
Dosage de l'argent à
l'état de sulfure

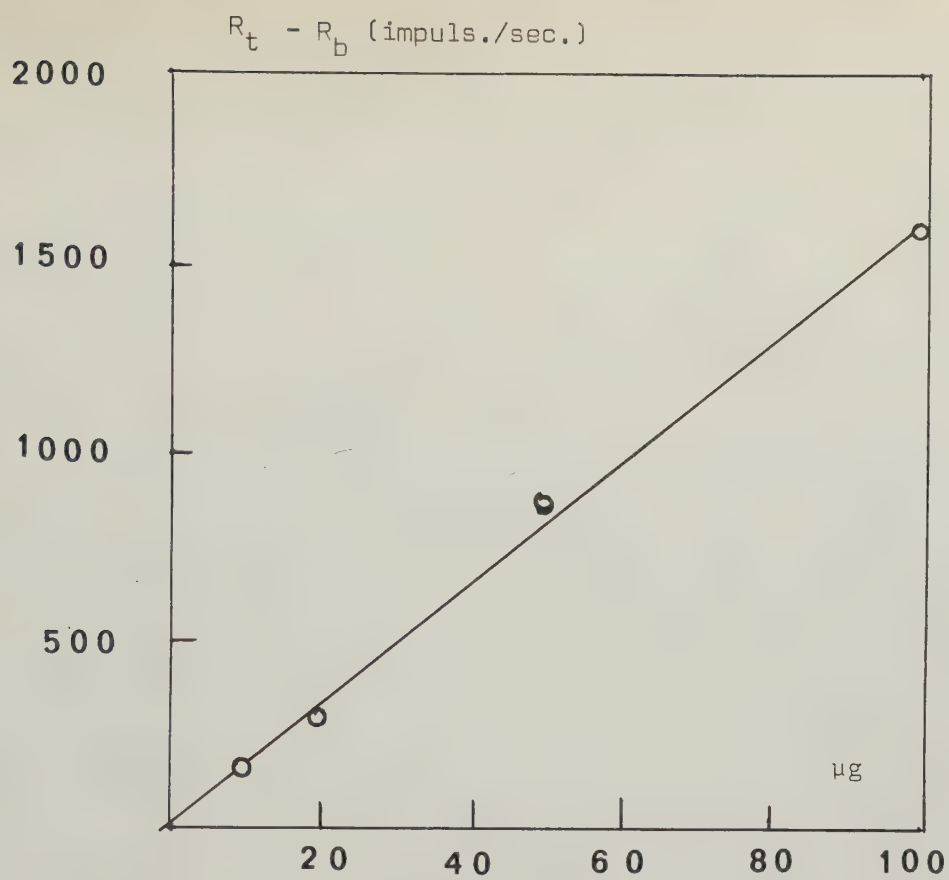


Figure n° 21
Dosage du bismuth
à l'état de sulfure

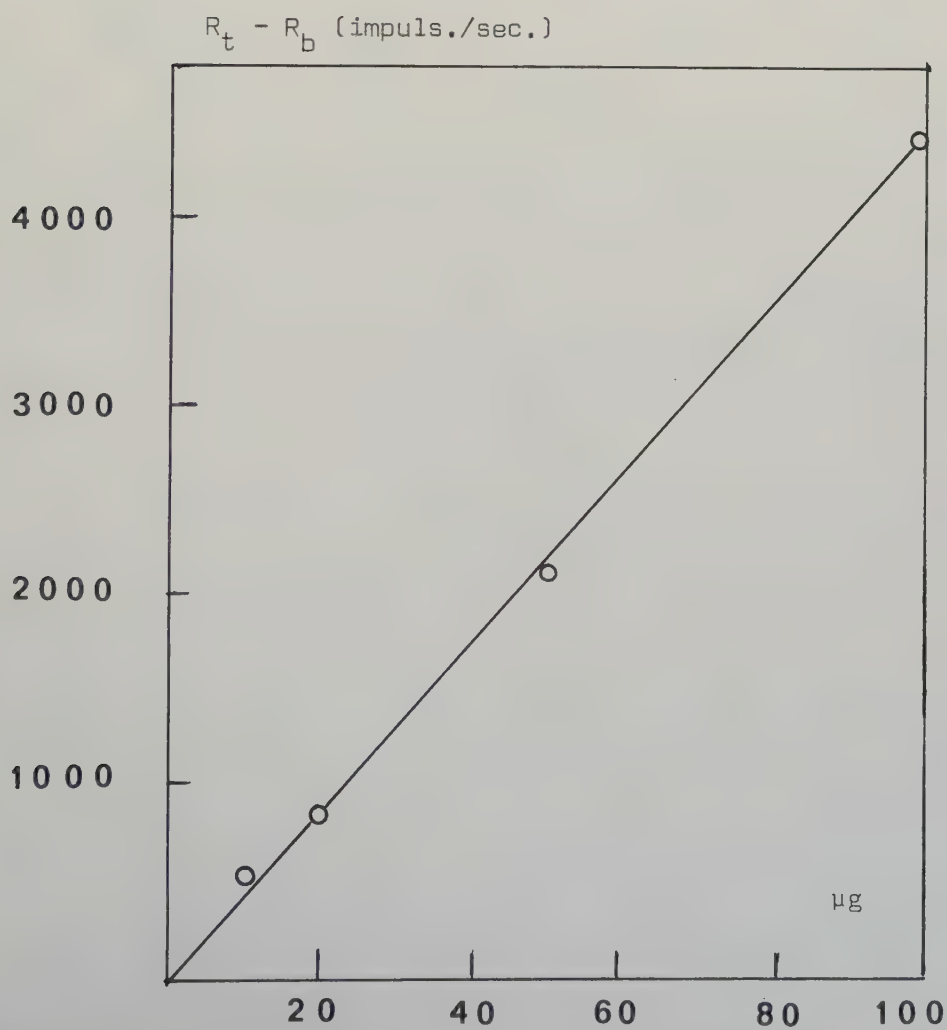


Figure n° 22
Dosage de l'arsenic
à l'état de sulfure

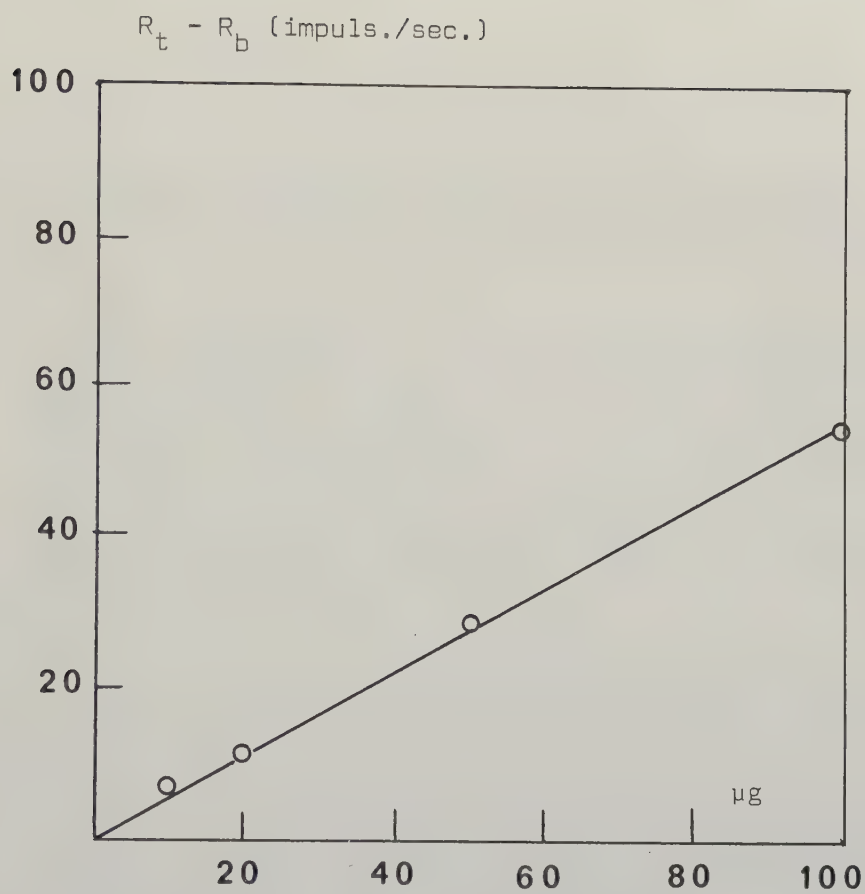


Figure n° 23

Dosage de l'antimoine
à l'état de sulfure

en matière plastique.

E - Discussion de la méthode

a - Choix du filtre

La principale difficulté que nous avons rencontrée pour isoler le précipité de sulfures a trait à la nécessité de retenir intégralement sur un filtre une quantité extrêmement faible d'un précipité colloïdal.

Les papiers filtres sans cendres, utilisés habituellement en Chimie analytique n'arrêtent pas de tels précipités. Pratiquement, nous n'avons trouvé que deux types de filtre dont la porosité soit suffisamment faible pour retenir les précipités de sulfures dans les conditions où nous opérons : les filtres Millipore et le papier en fibre de verre Whatman G.F/C. Mais nous avons dû écarter le filtre Millipore, qui ne nous a pas donné satisfaction, car il se déforme par séchage et devient friable. Finalement, le papier Whatman G.F/C s'est avéré le seul utilisable pour isoler quantitativement des précipités de sulfures colloïdaux.

b - Influence de la présence du cuivre sur la fluorescence X des précipités de sulfures

Pour isoler une faible quantité de toxique à l'état de sulfure insoluble, il est classique d'utiliser un entraîneur, qui est généralement le cuivre. C'est ainsi qu'opèrent BROOKS et ses collaborateurs (18) pour précipiter le mercure dans l'urine préalablement minéralisée, en vue de son dosage par spectrométrie de fluorescence X.

Il nous a paru intéressant de chercher le moyen de supprimer l'emploi d'un entraîneur, dont la présence diminue la sensibilité de la méthode de dosage dans une proportion importante, par le jeu des effets de matrice et de tiers-élément.

Cette influence apparaît nettement sur la figure n°24 qui représente deux courbes de référence établies avec des précipités de sulfure d'arsenic obtenus les uns sans entraîneur, les autres en présence de 500 µg de cuivre. Le fait d'employer un entraîneur a pour conséquence de diminuer la pente moyenne de la courbe de référence, qui passe de 30,9 à 10,4 imp./sec./µg, soit une diminution de 59,8 p.100. Encore, faut-il souligner que cette atténuation de la sensibilité correspond à une quantité minime d'entraîneur, bien inférieure à celles qui sont généralement utilisées pour la précipitation des éléments toxiques à l'état de sulfures et qui atteignent 1 ou 2 mg.

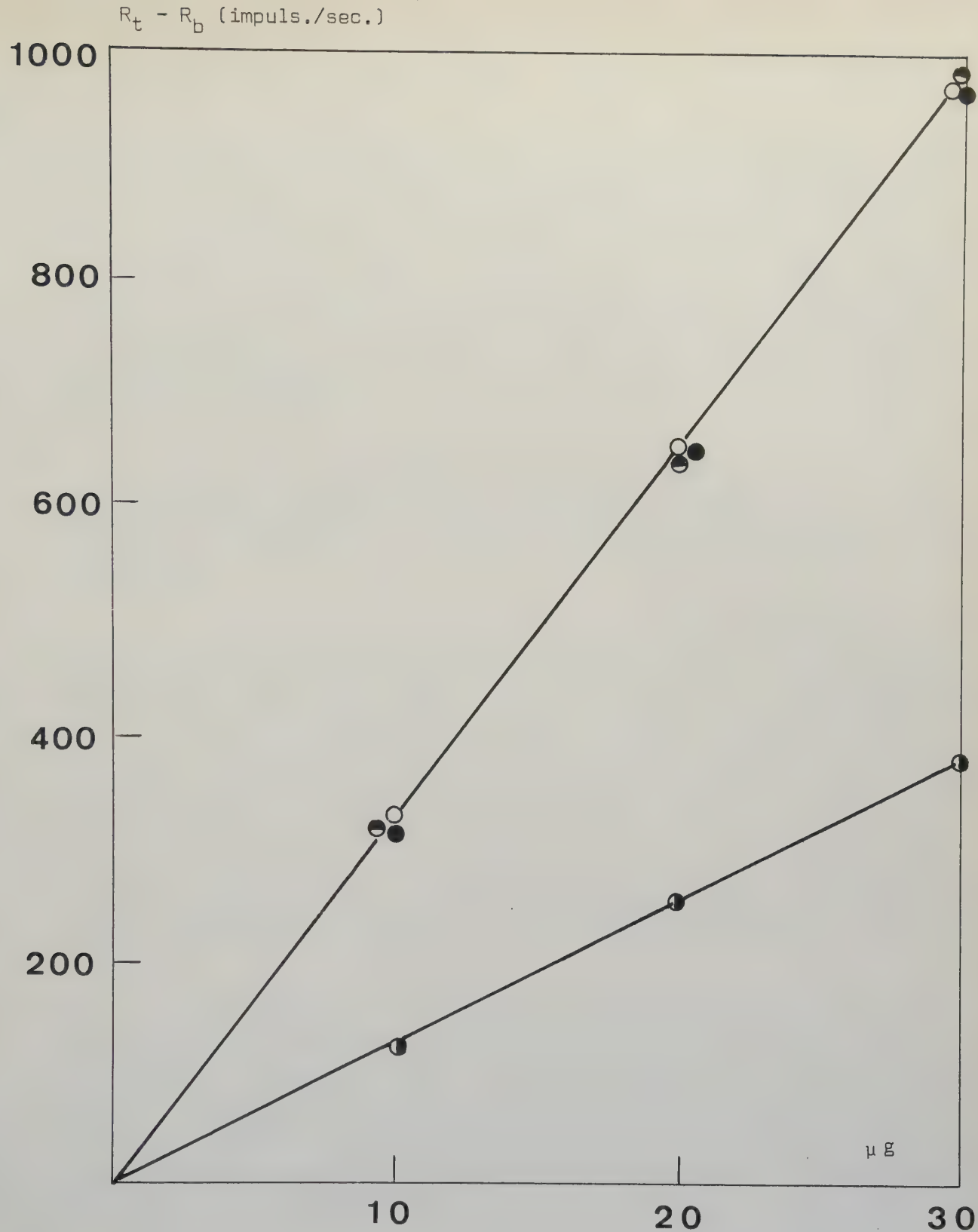


Figure n° 24 - Dosage des toxiques à l'état de sulfures

Influence du cuivre sur la fluorescence X de l'arsenic

- arsenic
- arsenic + 10 μg de cuivre
- arsenic + 5 μg de cuivre
- arsenic + 500 μg de cuivre

Mais, la précipitation sans entraîneur n'est possible que si deux conditions se trouvent réalisées. La première est que le précipité de sulfure soit intégralement retenu par le filtre, ce que nous avons pu obtenir grâce à l'emploi des filtres en fibre de verre. En second lieu, il faut que le précipité de sulfure ne soit accompagné d'aucun autre précipité, qui viendrait modifier sa fluorescence X par effet de matrice ou par effet de tiers-élément. La précipitation de deux éléments est en effet à redouter : celle du soufre colloïdal, due à l'oxydation de la thioacétamide par les composés oxydants éventuellement présents dans le liquide de minéralisation, ou celle du sulfure de cuivre, ce dernier étant un constituant normal de la plupart des milieux biologiques.

Nous avons déjà attiré l'attention sur la nécessité absolue d'éliminer toute trace de composé oxydant des liquides de minéralisation avant de procéder à la précipitation par la thioacétamide. Les moyens propres à réaliser cette élimination seront exposés en même temps que les méthodes de minéralisation.

En ce qui concerne l'influence du cuivre, nous avons dû examiner les conséquences que peut avoir la présence de cet élément sur la fluorescence X des précipités de sulfures, aux concentrations auxquelles il existe normalement dans les milieux biologiques. D'après les valeurs données par BOWEN (2), les taux les plus élevés de cuivre chez les Mammifères se trouvent dans le rein et dans le foie où ils atteignent respectivement 12 et 19 ppm exprimés par rapport aux tissus secs. Dans le sang, le taux normal de cuivre ne dépasse pas 1 ppm et il est inférieur à 10 µg/litre dans l'urine d'un sujet normal. Si l'on considère que les dosages des éléments toxiques par fluorescence X sont suffisamment sensibles pour qu'ils puissent être effectués sur des prises d'essai de 500 mg de matériel biologique desséché ou de 100 ml d'urine, il apparaît que les quantités de cuivre rencontrées dans les liquides de minéralisation ne dépassent pas, en général, 5 à 10 µg.

En examinant l'action du cuivre sur la fluorescence X des cinq éléments précipitables à l'état de sulfures, au moyen de la règle à calcul de BLANQUET (15), on constate que la présence de cuivre est susceptible d'atténuer la fluorescence X de l'arsenic, du bismuth et du mercure. C'est donc l'un d'entre eux, l'arsenic, que nous avons choisi pour étudier cette influence éventuelle du cuivre. Nous avons comparé les courbes de référence établies, entre 0 et 30 µg, avec des précipités de sulfure d'arsenic pur, et avec des précipités contenant en plus 5 ou 10 µg de cuivre. Ces courbes sont représentées sur la figure n° 24.

Les points, aux erreurs de comptage près, sont alignés et les trois courbes sont pratiquement confondues ; leurs pentes respectives sont d'ailleurs de 30,9 , 31,6 et 30,0 imp./sec./µg, donc extrêmement voisines les unes des autres. On peut déduire de ces résultats que le cuivre, à ses concentrations normales dans les milieux biologiques, ne perturbe pas le dosage des toxiques précipitables à l'état de sulfures, quand les prises d'essai sont de

l'ordre de 10 g pour les tissus et de 100 ml pour l'urine.

c - Sensibilités et limites de détection

Nous avons déterminé les sensibilités et les limites de détection de cette méthode en considérant uniquement la quantité d'élément présente sur le filtre, sans faire intervenir l'importance du poids ou du volume de l'échantillon analysé. Ces indications sont réunies dans le tableau n° 18. La sensibilité est très bonne pour le dosage de l'arsenic et du bismuth, dont il est possible de déceler des quantités inférieures à 0,5 µg. Elle reste bonne pour le dosage du mercure et de l'argent dont les limites de détection sont de l'ordre du µg. Par contre, en ce qui concerne l'antimoine, la sensibilité est médiocre ; la méthode ne permet pas de déceler moins de 17 µg de ce métalloïde.

2 - Enrichissement par extraction des toxiques à l'état de dithizonates

Quelques éléments toxiques importants, le plomb, le thallium et le zinc, qui ne sont pas précipitables à l'état de sulfures par la thioacétamide en milieu sulfurique, peuvent être extraits des liquides de minéralisation sous la forme de dithizonates solubles dans des solvants non miscibles à l'eau, tels que le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone.

D'une manière générale, les dithizonates métalliques (MDZ) se forment par réaction de la dithizone (HDZ), en solution organique, sur les ions métalliques (M^{n+}) en solution aqueuse, suivant la réaction :



La dissolution des dithizonates dans la phase organique est conditionnée par le pH de la phase aqueuse. Pour isoler les trois éléments que nous nous proposons d'étudier, nous avons intérêt à choisir un pH d'extraction qui leur soit commun, afin de les extraire ensemble, au cours d'une même opération. C'est pour cette raison que nous avons opéré sur une solution aqueuse tamponnée à pH 9.

l'ordre de 10 g pour les tissus et de 100 ml pour l'urine.

c - Sensibilités et limites de détection

Nous avons déterminé les sensibilités et les limites de détection de cette méthode en considérant uniquement la quantité d'élément présente sur le filtre, sans faire intervenir l'importance du poids ou du volume de l'échantillon analysé. Ces indications sont réunies dans le tableau n° 18. La sensibilité est très bonne pour le dosage de l'arsenic et du bismuth, dont il est possible de déceler des quantités inférieures à 0,5 µg. Elle reste bonne pour le dosage du mercure et de l'argent dont les limites de détection sont de l'ordre du µg. Par contre, en ce qui concerne l'antimoine, la sensibilité est médiocre ; la méthode ne permet pas de déceler moins de 17 µg de ce métalloïde.

2 - Enrichissement par extraction des toxiques à l'état de dithizonates

Quelques éléments toxiques importants, le plomb, le thallium et le zinc, qui ne sont pas précipitables à l'état de sulfures par la thioacétamide en milieu sulfurique, peuvent être extraits des liquides de minéralisation sous la forme de dithizonates solubles dans des solvants non miscibles à l'eau, tels que le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone.

D'une manière générale, les dithizonates métalliques (MDZ) se forment par réaction de la dithizone (HDZ), en solution organique, sur les ions métalliques (M^{n+}) en solution aqueuse, suivant la réaction :



La dissolution des dithizonates dans la phase organique est conditionnée par le pH de la phase aqueuse. Pour isoler les trois éléments que nous nous proposons d'étudier, nous avons intérêt à choisir un pH d'extraction qui leur soit commun, afin de les extraire ensemble, au cours d'une même opération. C'est pour cette raison que nous avons opéré sur une solution aqueuse tamponnée à pH 9.

Elément	Raie mesurée	Sensibilité - imp./sec./ μ g -	Limite de détection* - μ g -
Antimoine	Sb $K\alpha_1$	0,5	17,5
Arsenic	As $K\alpha$	44,0	0,1
Argent	Ag $K\alpha_1$	5,7	1,7
Bismuth	Bi $L\alpha_1$	15,0	0,3
Mercure	Hg $L\beta_1$	9,5	0,6

* La plus petite quantité de toxique décelable sur le filtre d'une manière significative.

TABLEAU n° 18 - Dosage des toxiques à l'état de sulfures insolubles
Sensibilités et limites de détection

A - Principe

Le liquide de minéralisation, débarrassé de ses composés oxydants par addition d'hydroxylamine, est neutralisé et tamponné à l'aide d'une solution d'ammoniaque et de chlorure d'ammonium de pH égal à 9. Le liquide est agité avec une solution chloroformique concentrée de dithizone : on commence l'extraction avec 5 ml de cette solution et on la continue en ajoutant des fractions de 0,5 ml, jusqu'à ce que la phase organique conserve une teinte violacée après agitation prolongée, ce qui traduit la présence d'un excès de dithizone et indique par conséquent que tous les éléments complexes ont été extraits.

La phase chloroformique est décantée dans un ballon et concentrée sous vide dans un évaporateur rotatif. Le petit volume de liquide résiduel est évaporé sur une pastille de poudre de cellulose pure, placée sur une plaque chauffante, sous un léger courant d'air. Cette pastille est desséchée sous vide phosphorique et broyée au mortier d'agate ; la poudre obtenue, triturée jusqu'à ce qu'elle présente une teinte parfaitement homogène est ensuite utilisée pour confectionner une pastille qui est analysée par fluorescence X.

B - Matériel

a - Moule pour la préparation des pastilles de taille réduite

Afin de ne pas diluer les dithizonates dans une trop grande quantité de poudre de cellulose, nous sommes obligés d'utiliser une quantité de poudre relativement réduite (50 mg), égale au 1/10^e de la quantité habituellement employée pour préparer les pastilles de poudre d'organes examinées par fluorescence X. Nous avons donc été amenés à faire confectionner, par un atelier de mécanique, un moule spécial qui permette de ramener le diamètre des pastilles de 25 à 10 mm.

b - Dispositif d'évaporation

La pastille de poudre de cellulose sur laquelle on dépose la solution chloroformique de dithizonate est placée dans une coupelle en polyéthylène de 15 mm de diamètre. Cette coupelle repose sur une plaque chauffante, dont la température est maintenue à 60° (plaque chauffante "BUHLER" avec thermomètre et thermostat). Une pompe à membrane, dont le débit est voisin de 1l/min., dirige sur la coupelle un jet d'air qui dissipe les vapeurs de chloroforme et accélère ainsi l'évaporation du solvant. La solution chloro-

formique de dithizone est déposée goutte à goutte sur la pastille de poudre de cellulose au moyen d'une ultra-microburette, par exemple d'une microseringue "AGLA", équipée d'une aiguille de verre coudée.

C - Mode opératoire

Cent ml de liquide de minéralisation sont mesurés dans une ampoule à décanter de 250 ml et additionnés de 1 ml d'une solution saturée d'hydroxylamine et de 10 ml d'une solution tampon de pH 9 contenant 60 ml d'ammoniaque et 50 g de chlorure d'ammonium par litre. On ajoute alors 5 ml d'une solution chloroformique de dithizone à 20 mg/ml. et on agite énergiquement pendant 5 minutes environ. Si la phase organique présente une teinte bleue violacée, on peut considérer que la dithizone libre est en excès et que tous les cations complexables ont été extraits. Dans le cas contraire, quand la phase chloroformique présente une teinte rouge à la fin de l'agitation, il est nécessaire de poursuivre l'extraction en ajoutant la solution de dithizone, par fraction de 0,5 ml, jusqu'à une teinte violacée persistante indiquant la présence d'un excès de réactif.

La solution de dithizonates est recueillie dans un petit ballon adaptable sur un évaporateur rotatif. La phase aqueuse est lavée avec 5 ml de chloroforme qui sont joints au contenu du ballon. La solution est concentrée sous vide à une température voisine de 40° jusqu'à réduction de son volume à 0,2 ml environ. Le liquide résiduel est aspiré dans l'ultra-microburette ; le ballon est rincé à deux reprises avec 0,1 ml de chloroforme qui sont également aspirés dans l'ultra-microburette.

A l'aide du dispositif qui a été décrit, on dépose la solution chloroformique goutte à goutte sur une pastille de poudre de cellulose, en veillant à ce que chaque goutte soit évaporée avant d'ajouter la suivante. Cette pastille a été préparée en comprimant, à la main, 50 mg de poudre de cellulose pure pour chromatographie. Il est essentiel que la pression appliquée sur cette pastille soit très légère, si l'on veut que cette dernière absorbe bien la solution et qu'elle puisse être broyée ultérieurement. Lorsque tout le liquide a été évaporé, l'ultra-microburette est rincée avec quelques gouttes de chloroforme qui sont déposées à leur tour sur la pastille.

La coupelle contenant la pastille est placée sous vide phosphorique pendant quelques heures pour éliminer les traces d'humidité, qui ont pu être entraînées par le chloroforme. La pastille est broyée dans un mortier d'agate et triturée jusqu'à obtention d'une poudre de teinte homogène. Cette poudre est comprimée dans le moule de 10 mm de diamètre sur un disque de papier Whatman n° 1 de 20 mm de diamètre, qui sert de support à la pastille. Le mélange de cellulose et de dithizonate adhère suffisamment au papier pour que ce dernier puisse être manipulé sans risque de détériorer l'échantillon.

Sur cette pastille, on mesure la fluorescence X (R_t) :

du plomb ($L\beta_1\beta_2$: $14,15^\circ$)

du thallium ($L\alpha_1$: $17,48^\circ$)

du zinc ($K\alpha_1$: $20,92^\circ$)

en mesurant la fluorescence de base (R_b) sur un échantillon blanc préparé avec une pastille de poudre de cellulose à laquelle on a incorporé 100 μg de dithizone par évaporation de la solution chloroformique.

Les valeurs ($R_t - R_b$) sont reportées sur des courbes de référence établies dans les mêmes conditions avec des quantités connues de chacun des toxiques.

D - Préparation de la gamme de référence

Pour chaque élément, la gamme de référence est préparée en extrayant 10, 20, 30 et 40 μg de toxique de 100 ml d'une solution aqueuse et en poursuivant les manipulations indiquées dans le mode opératoire.

Nous avons reproduit sur les figures n° 25, 26 et 27 les courbes de référence que nous avons établies en vue du dosage du plomb, du thallium et du zinc.

E - Discussion de la méthode

a - Choix du support des dithizonates

Plusieurs auteurs évaporent des solutions aqueuses contenant les éléments à rechercher sur des disques de papier filtre pour réaliser des dépôts qui sont ensuite examinés par fluorescence X. Cette méthode a notamment été adoptée par MARCIE (40) pour doser les éléments toxiques dans l'eau, après les avoir extraits sous forme de dithiocarbamates solubles dans le tétrachlorure de carbone.

En expérimentant ce procédé d'évaporation, nous avons remarqué qu'il présente plusieurs inconvénients. En premier lieu, si l'on veut que le

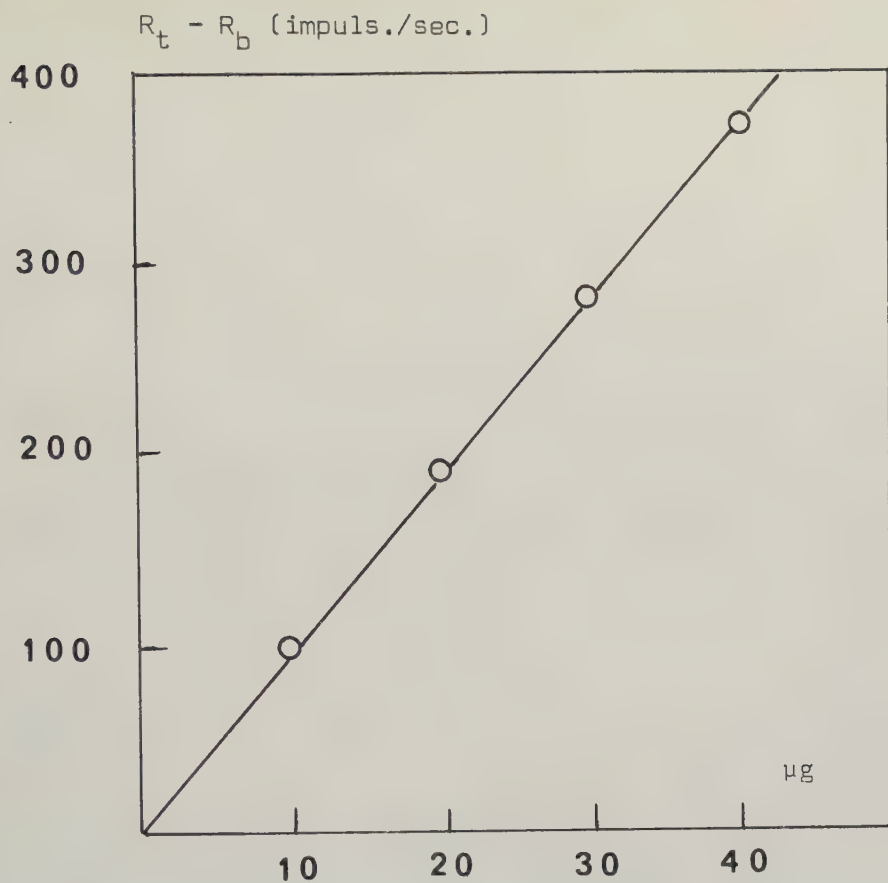


Figure n° 25

Dosage du zinc
à l'état de dithizonate

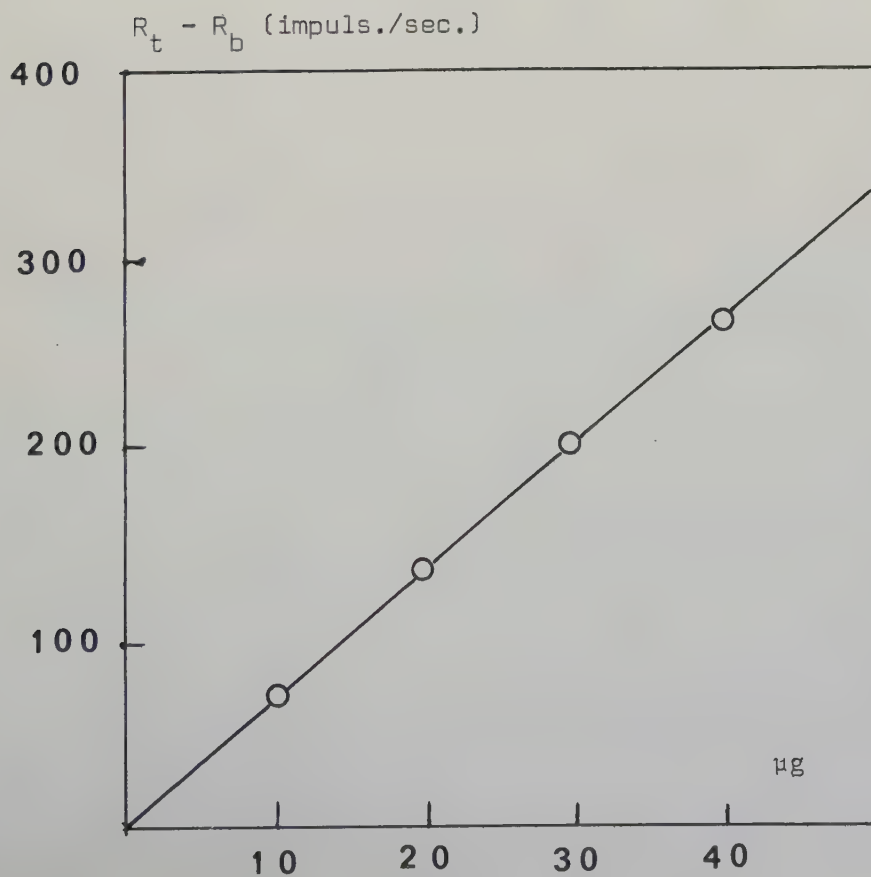


Figure n° 26

Dosage du plomb
à l'état de dithizonate

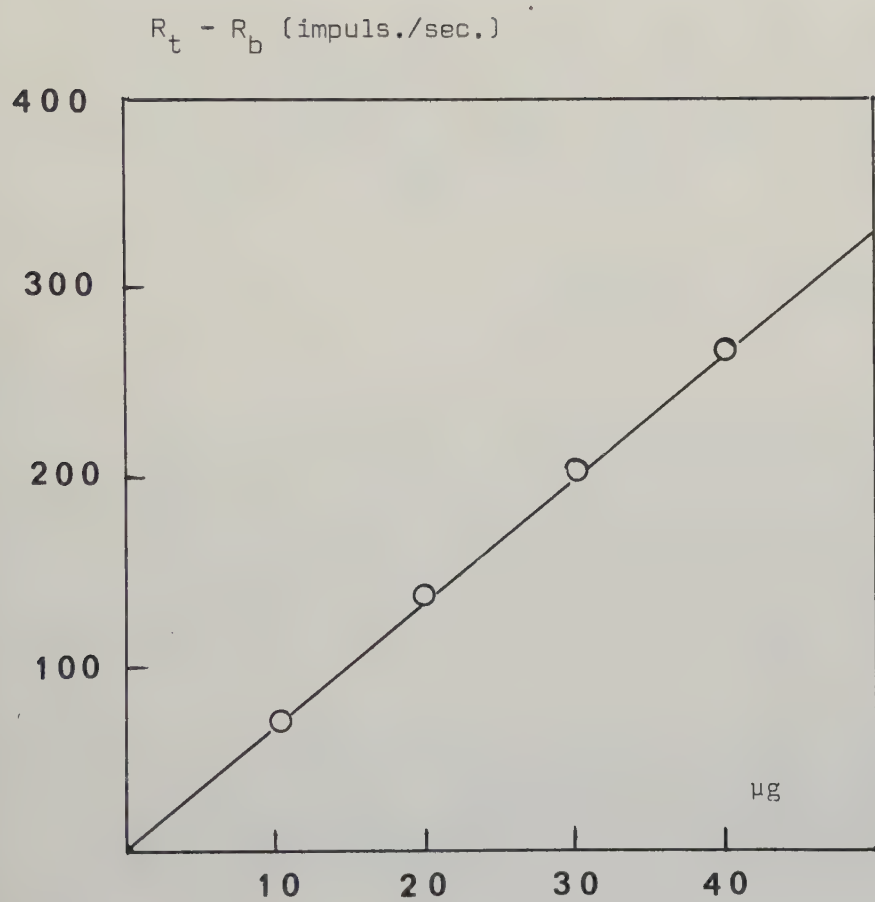


Figure n° 27

Dosage du thallium
à l'état de dithizonate

dépôt ne dépasse pas le diamètre imposé par les dimensions du faisceau de radiations excitatrices, il faut évaporer la solution avec de très grandes précautions, qui exigent beaucoup de temps. D'autres part, il est impossible de réaliser par ce moyen un dépôt homogène à partir d'une solution organique. L'addition de chaque goutte de solution, provoque une chromatographie, ce qui conduit à la formation d'un dépôt en forme d'anneau qui est irrégulièrement réparti sur les deux faces du papier filtre. Cette répartition défec- tueuse des dithizonates explique que les mesures de fluorescence X ne sont pas exactement reproductibles d'un échantillon à l'autre.

Nous avons cherché un autre support qui puisse servir à l'analyse des dithizonates par fluorescence X. Après plusieurs essais préliminaires, nous nous sommes arrêtés à la poudre de cellulose. Les dithizonates peuvent être mélangés à cette poudre pour former un mélange qui, par compression, fournit une pastille ayant l'apparence d'un disque de papier d'épaisseur régulière et de composition homogène.

b - Contrôle de l'homogénéité des pastilles de cellulose et de dithizonates

La poudre de cellulose, support inerte, et les dithizonates de métaux fluorescents aux rayons X étant mélangés par trituration, nous avons jugé utile de contrôler l'homogénéité des pastilles. Nous avons procédé à cette vérification en appliquant le principe déjà utilisé pour le contrôle de l'homogénéité des pastilles de poudres d'organes desséchés. La fluorescence X de la raie $L\beta_1\beta_2$ du plomb ($14,15^\circ$) a été mesurée sur trois pastilles renfermant 10, 20 et 40 μg de ce métal, à l'état de dithizonate, pour huit orientations des pastilles, différant entre elles de 45° environ.

La dispersion de ces huit mesures, est du même ordre de grandeur que la dispersion due au comptage (tableau n° 19). La fluorescence de la pastille est donc indépendante de son orientation sur le porte-échantillon du spectro-diffractomètre, car les mélanges de poudre constituant les pastilles sont homogènes.

c - Sensibilités et limites de détection

Les sensibilités et les limites de détection calculées à partir des courbes de référence, reproduites sur les figures n° 25, 26 et 27 sont indiquées dans le tableau n° 20.

La sensibilité des dosages est bonne, puisque à chaque μg de toxique correspondent 7 imp./sec. pour le plomb et le thallium et 9 imp./sec. pour le zinc.

Poids du plomb contenu dans la pastille - µg -	10	20	40
Fluorescence X	326	370	463
mesurée pour	327	361	460
8 orientations	326	355	463
des pastilles	334	365	472
(rotation de 45°)	321	363	470
raies $L\beta_1\beta_2$ Pb (14,15°)	321	363	461
[R]	331	362	469
- imp./sec. -	333	376	463
$\bar{R}$	327	364	465
s	5,00	6,29	4,51
Dispersion due à l'hétérogénéité			
$\bar{R} \pm \frac{3,5 s}{\bar{R}} \times 100$	$327 \pm 5 \text{ p.100}$	$364 \pm 6 \text{ p.100}$	$465 \pm 3 \text{ p.100}$
Prob. 99 p.100			
Dispersion due au comptage			
$\bar{R} \pm \frac{2,6 \sqrt{\bar{R}}}{t} \times 100$	$327 \pm 1,5 \text{ p.100}$	$364 \pm 1,3 \text{ p.100}$	$465 \pm 2 \text{ p.100}$
Prob. 99 p.100			

TABLEAU n° 19 - Dosage des toxiques à l'état de dithizonates

Contrôle de l'homogénéité des pastilles

Elément	Raie mesurée	Sensibilité - imp./sec./ μ g -	Limite de détection - μ g -
Plomb	Pb $L\beta_1\beta_2$	7,0	1,1
Thallium	Tl $L\alpha_1$	7,0	1,0
Zinc	Zn $K\alpha_1$	9,4	0,4

TABLEAU n°20 - Dosage des toxiques à l'état de dithizonates

Sensibilités et limites de détection

Par ailleurs, cette méthode permet de détecter dans un liquide de minéralisation des quantités de plomb, de thallium ou de zinc qui sont de l'ordre du μg .

Compte tenu de ces valeurs, il est aisé de calculer le poids ou le volume de milieu biologique qu'il faut analyser pour atteindre la sensibilité désirée.

Observation

La méthode de dosage par spectrométrie de fluorescence X des éléments à l'état de dithizonates peut aussi être appliquée au mercure. L'extraction par la solution chloroformique de dithizone doit alors être effectuée à pH 1, en présence d'acide oxalique. La sensibilité est de 4 imp./sec./ μg et la limite de détection de 2 μg .

Dans cette étude, nous avons limité notre expérimentation à quatre éléments : le plomb, le thallium, le zinc et le mercure. Mais, il semble que la méthode qui utilise l'enrichissement sous forme de complexes solubles dans le chloroforme puisse être étendue au dosage de beaucoup d'autres éléments formant des dithizonates stables.

Peut-être serait-il possible d'agrandir encore le champ de ses applications et de lui donner un caractère plus général, en remplaçant la dithizone par un autre chélateur, le dithiocarbamate de pyrrolidine, préconisé par MARCIE (40). Ce réactif permettrait d'extraire simultanément, à pH 4,5 quinze éléments toxiques.

3 - Choix des méthodes de minéralisation

Le choix d'une méthode de minéralisation en vue de la recherche des éléments toxiques dans un milieu biologique est guidé par le souci de ne pas perdre de toxiques au cours des manipulations et d'obtenir un liquide final qui ne renferme pas de produits susceptibles de gêner la suite de l'analyse. Il faut aussi tenir compte de la complexité du milieu analysé, surtout de sa richesse en composés organiques, ce qui conduit à distinguer, d'une part, les milieux tels que le sang ou les viscères, difficiles à minéraliser, d'autre part, l'urine, peu chargée en substances organiques et plus facilement minéralisable.

A - Minéralisation de l'urine

Nous avons appliqué la méthode sulfo-permanganique, méthode classique pour minéraliser l'urine, adoptée en particulier par BROOKS et ses collaborateurs (18) pour le dosage du mercure par spectrométrie de fluorescence X.

Un volume d'urine de 50 ml est mesuré dans un ballon à col rôdé et additionné de 10 ml d'acide sulfurique pur et de 1 g de permanganate de potassium pur en cristaux. Le mélange est abandonné pendant quelques heures à la température du laboratoire. L'oxydation commence à froid, ce qui facilite la destruction ultérieure des matières organiques.

Le contenu du ballon est ensuite porté à l'ébullition sous réfrigérant ascendant pendant trente minutes. Si le liquide se décolore, il faut ajouter du permanganate de potassium et poursuivre ces additions jusqu'à ce que le liquide conserve une teinte brune après trente minutes d'ébullition. Après refroidissement, on ajoute 2 ml d'une solution saturée d'hydroxylamine pour détruire l'excès de permanganate de potassium. On porte à nouveau à l'ébullition pendant quelques minutes et on rince le réfrigérant avec 20 ml d'eau distillée. Le liquide de minéralisation complété à 100 ml avec de l'eau distillée est directement utilisable pour la précipitation des sulfures par la thioacétamide à chaud ou pour l'extraction par la solution chloroformique de dithizone.

B - Minéralisation des milieux biologiques

Etant donné la sensibilité des méthodes de dosage par spectrométrie de fluorescence X après enrichissement, il n'est pas nécessaire de minéraliser de grandes quantités de tissu biologique.

Un poids de 1 à 2 g de substance fraîche donnant 300 à 600 mg de résidu sec permet de doser des concentrations qui sont de l'ordre de quelques ppm. La méthode préconisée par SCHÖNIGER nous a paru particulièrement bien adaptée à une minéralisation de ce genre. Elle consiste à brûler le produit biologique desséché dans un récipient clos renfermant de l'oxygène pur. Ce procédé permet une minéralisation rapide d'un milieu biologique sec, sans pertes et sans addition de réactifs susceptibles d'entraver la suite de l'analyse.

Nous avons appliqué cette méthode de minéralisation en utilisant l'appareil de GUTENMANN et LISK (30) (31). Cet appareil représenté sur la figure n° 28, se compose d'un ballon en verre Pyrex d'une capacité de 5 000 ml, fermé par un bouchon à rôdage hémisphérique. Sur celui-ci est fixé une tige

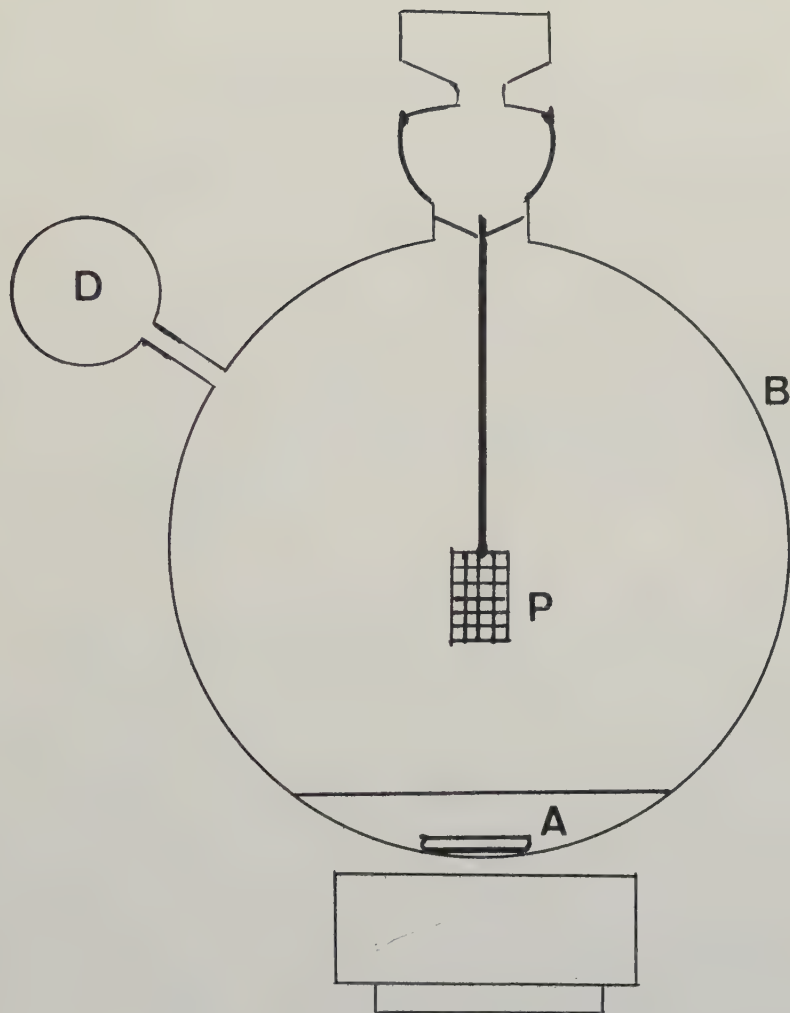


Figure n° 28 - Appareil de GUTENMANN et LISK

- A - Barreau aimanté
- B - Ballon de verre pyrex (5000 ml)
- D - Ballonnet de caoutchouc
- P - Porte-échantillon en platine

en platine supportant une nacelle, constituée d'une grille également en platine, qui joue le rôle de porte-échantillon.

Pendant la combustion, le bouchon est maintenu par une pince métallique, munie d'une vis de blocage. Pour éviter que la surpression provoquée par l'échauffement de l'oxygène au cours de la combustion entraîne l'explosion du ballon de verre, ce dernier porte une tubulure latérale sur laquelle est adaptée un ballonnet de caoutchouc qui se gonfle sous l'effet de la dilatation de l'oxygène et atténue la surpression.

Une minéralisation effectuée à l'aide de cet appareil doit être conduite de la manière suivante : un poids de matière sèche voisin de 300 mg est pesé avec précision sur un carré d'acétate de cellulose d'environ 5 cm de côté ; la feuille de cellulose est pliée de manière à former un sachet dans lequel on insère une bandelette de papier sans cendres de 10 x 0,3 cm, qui joue le rôle d'une mèche d'allumage. Ce sachet est fixé dans le porte-échantillon.

D'autre part, on mesure dans le ballon 80 ml d'acide sulfurique 0,1 N et on y introduit le barreau aimanté d'un agitateur magnétique qui assurera l'agitation du liquide pendant et après la combustion. Le ballon est placé sur un support en forme d'anneau au-dessus de l'agitateur magnétique. Ensuite, on fait passer dans le ballon un courant d'oxygène pur pendant plusieurs minutes, de manière à réaliser un rinçage qui chasse la totalité de l'air primitivement contenu dans le ballon. On enflamme la mèche de papier. On met immédiatement le bouchon en place et on le bloque avec la pince métallique. La combustion de l'échantillon dure environ 30 secondes. Les fumées de toxiques dégagées dans l'atmosphère du ballon sont dissoutes en agitant la solution d'acide sulfurique à l'aide de l'agitateur magnétique. Cette opération doit être poursuivie pendant trente minutes environ. Enfin, l'intérieur du ballon est lavé avec la solution sulfurique qui est transvasée dans un ballon de 200 ml à col rôdé pouvant venir s'adapter sur un réfrigérant ascendant. Le ballon ayant servi à la combustion est rincé à deux reprises avec 5 ml d'acide sulfurique 0,1 N qui sont joints aux 80 ml d'acide précédents. On ajoute 5 ml d'une solution d'hydroxylamine et on porte à l'ébullition pendant 5 minutes sous réfrigérant ascendant afin de détruire les composés oxygénés de l'azote qui ont pu prendre naissance au cours de la combustion. L'emploi de ce réfrigérant est indispensable pour éviter les pertes d'ions mercuriques éventuellement présents dans le liquide de minéralisation. Après refroidissement du ballon, on rince le réfrigérant avec 5 ml d'eau distillée. On obtient un liquide de minéralisation débarrassé de ses composés oxydants qui peut être directement utilisé pour la précipitation des sulfures ou l'extraction des dithizonates.

Si le poids de produit sec à minéraliser dépasse 300 mg, la combustion de tout l'échantillon ne peut pas être effectuée en une seule fois. Il faut procéder à des opérations successives sans changer l'acide sulfurique contenu dans le ballon et en veillant à bien dissoudre la totalité des fumées avant de procéder au balayage avec l'oxygène pur.

4 - Evaluation de la justesse et de la répétabilité des analyses après minéralisation et enrichissement

La justesse et la répétabilité ont été déterminées en procédant au dosage de quelques toxiques : antimoine, arsenic et mercure dans des échantillons de foie ou d'urine après minéralisation par le mélange sulfo-permanganique ou par combustion en vase clos dans l'oxygène pur, et précipitation à l'état de sulfures.

Les déterminations de justesse et de répétabilité ont porté sur plusieurs concentrations de chacun des toxiques étudiés, chaque détermination a été effectuée à l'aide d'une série de six essais. A partir des résultats obtenus, nous avons calculé, pour chaque concentration de toxique, la concentration moyenne trouvée et l'écart de confiance correspondant.

Les résultats de ces essais sont rapportés dans le tableau n° 21. Les écarts de confiance varient de 0,2 à 11,6 p.100. La répétabilité de la méthode paraît donc satisfaisante.

En ce qui concerne la justesse, il n'existe pas d'erreur systématique dans le dosage de l'arsenic ou de l'antimoine dans l'urine, puisque les quantités théoriques de toxique contenues dans les échantillons analysés sont comprises entre les limites des écarts de confiance. Par contre, lors du dosage du mercure dans l'urine, les résultats obtenus sont entachés d'une légère erreur par défaut, de l'ordre de 15 p.100. Cette erreur n'est pas surprenante quand on connaît les risques de perte qui existent au cours des manipulations en raison de la volatilité des sels mercuriques. Le dosage de l'arsenic dans le foie est également entaché d'une erreur par défaut voisine de 10 p.100. Comme cette erreur n'a pas été retrouvée lors du dosage de l'arsenic dans l'urine, il faut admettre que les pertes sont inhérentes à la méthode de minéralisation.

Elément	Arsenic	Arsenic	Arsenic *	Antimoine	Antimoine	Mercure	Mercure
Milieu biologique	Urines	Urines	Foie	Urines	Urines	Urines	Urines
Concentration théorique	0,400 - mg/l -	0,500 - mg/l -	7,5 - ppm -	0,200 - mg/l -	0,500 - mg/l -	0,250 - mg/l -	1 - mg/l -
Quantité de toxique théorique sur l'échantillon - µg -	20	25	10	10	25	12,5	50
Quantités retrouvées	20,8 19,9 19,2	22,5 25,0 24,3	8,36 8,00 9,12	9,9 10,0 9,9	23,8 25,0 27,0	11,5 9,7 8,7	48,3 50,2 47,2
(x)	21,1	22,8	9,07	10,0	26,4	9,0	46,2
- µg -	19,8	21,0	8,06	10,0	24,1	10,7	47,8
	19,9	22,2	7,56	10,0	24,1	9,2	47,8
$\bar{x}$	20,1	23,3	8,36	9,9	25,1	9,8	47,9
s_m	0,29	0,60	0,28	0,01	0,54	0,44	0,54
Ecart de confiance Prob. 95 p. 100	$\pm 3,7$ p.100	$\pm 6,7$ p.100	± 8 p.100	$\pm 0,2$ p.100	± 5 p.100	$\pm 11,6$ p.100	$\pm 2,9$ p.100

* Minéralisation par combustion dans l'oxygène pur

TABLEAU n°21 - Dosage des toxiques dans les milieux biologiques après minéralisation
Evaluation de la justesse et de la répétabilité

III - Limites d'utilisation de l'analyse par

spectrométrie de fluorescence X pour le dosage

des éléments toxiques dans les milieux biologiques

Arrivés au terme de l'étude que nous nous étions proposés d'effectuer, nous sommes en mesure, à la lumière des renseignements que nous avons recueillis, d'apporter quelques précisions sur les possibilités qu'offre la spectrométrie de fluorescence X dans le domaine de l'analyse toxicologique des milieux biologiques.

L'analyse directe des milieux biologiques, préalablement desséchés, pulvérisés et comprimés sous forme de pastilles, est incontestablement la méthode la plus séduisante du fait de sa simplicité et de sa rapidité. Au cours de ce travail, nous avons montré que cette méthode fournit des résultats dont la justesse et la répétabilité sont comparables à celles des autres méthodes physico-chimiques, qui sont couramment employées en Toxicologie et qui sont beaucoup plus complexes. Son point faible se situe sur le plan de la sensibilité. Nous avons déterminé les limites de détection de cette méthode pour le dosage de sept toxiques dans les tissus où ils ont tendance à s'accumuler lors des intoxications aiguës. Afin de situer ces limites de détection par rapport aux concentrations que l'on peut rencontrer dans de telles intoxications, nous avons rassemblé dans le tableau n° 22 quelques valeurs que nous avons recueillies dans les ouvrages ou dans les publications de Toxicologie médico-légale. En comparant les taux indiqués avec les seuils de détection que nous avons calculés et qui figurent dans le tableau n° 11, on peut constater que, dans la majorité des cas, ces taux sont dix ou même cent fois plus grands que les plus faibles concentrations qu'il est possible de déceler par spectrométrie de fluorescence X.

Cette méthode s'avère donc utilisable, pour doser des toxiques minéraux, tels que le plomb, l'arsenic, le thallium ... etc, dans les viscères prélevés sur les victimes d'intoxication mortelle.

Toutefois, comme quelques taux cités dans le tableau n° 22, ne dépassent que légèrement les limites de détection, la prudence commande d'adopter une conduite différente suivant les résultats des dosages :

1er cas : le taux de toxique trouvé est inférieur au seuil de détection ; l'échantillon analysé peut être considéré comme ne renfermant pas le toxique recherché à une concentration qui corresponde à une intoxication aiguë ;

2ème cas : le taux de toxique trouvé est nettement significatif, c'est-à-dire, supérieur à trois fois le seuil de détection ; le résultat du dosage peut être tenu pour valable ;

3ème cas : le taux de toxique trouvé se situe dans la zone d'incertitude qui va du seuil de détection à trois fois la valeur de ce seuil. Le résultat du dosage est alors entaché d'une forte erreur et, pour lever le doute qui l'entoure, il faut recourir à l'une des méthodes qui sont applicables après minéralisation et enrichissement et dont les sensibilités sont beaucoup plus grandes.

Bien entendu, la méthode d'analyse par mesure directe de la fluorescence X sur les échantillons de tissus desséchés a une sensibilité beaucoup trop faible pour qu'elle puisse présenter de l'intérêt dans la mise en évidence des intoxications à long terme, qui exige souvent de pouvoir doser des taux de toxiques inférieurs à 1 ppm.

Elément	Foie* - ppm -	Rein* - ppm -	Poumon* - ppm -	Sang* - mg/l -
Arsenic	1 (7) 7,2 à 127 (17) 0,02 à 1437 (51)	1 (7) 0,01 à 120 (51)	0,2 (7)	traces (7) 0,02 à 135 (51)
Plomb	400 (7) 50 (5) 0,37 à 350 (51)	40 (7) traces (5) 2,5 à 300 (51)	51 (7) traces (7)	0,5 à 12,3 (51)
Thallium	50 (7) 14 (7) 34 (9) 58 (4) 3 à 9,3 (51) 72	50 (7) 42 (9) 90 (4) 98 (26) 42 (49) 2,5 à 20,5 (51)	66 (4) 67 (26)	140 (4) 55 (49)
Mercure	2 à 30 (5) 7 à 100 (51)	20 à 80 (5) 13 à 280 (51)		jusqu' 3 (5) 2,25 (16) 0,2 à 50 (51)

* exprimé par rapport au poids de tissu frais

TABLEAU n° 2 2 - Concentrations trouvées dans les milieux biologiques
au cours des intoxications aiguës

La possibilité d'atteindre des limites aussi basses existe avec les méthodes qui reposent sur la mesure de la fluorescence X des éléments après leur isolement par un procédé d'enrichissement à partir d'un liquide de minéralisation. Nous indiquons dans le tableau n° 23 les limites de détection qu'il est possible d'atteindre par de telles méthodes avec des prélèvements de 2 g. de viscères ou de 50 ml d'urine. La plupart des valeurs sont situées au-dessous des seuils qui marquent les limites des imprégnations toxiques de l'organisme humain, à l'exception toutefois de l'antimoine dont la fluorescence X est peu intense. Ces limites de sensibilités peuvent d'ailleurs être abaissées autant qu'il est nécessaire. Pour cela, il suffit d'augmenter le poids ou le volume de l'échantillon analysé. Il est ainsi possible d'atteindre des seuils de détection extrêmement bas de l'ordre du centième de ppm.

Élément	Viscères		Urines	
	poids de l'échantillon - g -	Limite de détection - ppm -	Volume de l'échantillon - ml -	Limite de détection - mg/l -
Antimoine (1)	2	9,0	200	0,080
Arsenic (1)	2	0,05	50	0,002
Argent (1)	2	0,8	50	0,034
Bismuth (1)	2	0,2	50	0,006
Mercure (1)	2	0,4	50	0,014
Plomb (2)	2	0,5	50	0,020
Thallium (2)	2	0,5	50	0,020
Zinc (2)	2	0,2	50	0,008

(1) Toxiques précipités à l'état de sulfures

(2) Toxiques extraits à l'état de dithizonates

TABLEAU n° 2 3- Dosage des éléments toxiques dans les milieux biologiques
après minéralisation et enrichissement

Tableau récapitulatif des limites de détection
en fonction du poids ou du volume des échantillons

IV - Conclusions

Notre travail a pour but d'étudier et de mettre au point, en vue de leur utilisation en Toxicologie, plusieurs méthodes de dosage des éléments minéraux, basées sur l'emploi de la spectrométrie de fluorescence X.

De ce travail, se dégagent les conclusions suivantes :

1) Toutes les méthodes que nous proposons sont en fait des méthodes quantitatives ; l'identification d'un toxique découle des résultats de son dosage, qui indiquent nécessairement s'il est présent ou non dans le milieu analysé à une concentration supérieure au seuil de détection.

2) La spectrométrie de fluorescence X semble être une méthode d'analyse qui convient parfaitement au dosage des éléments minéraux dans les poussières de l'atmosphère, notamment dans le domaine de l'Hygiène industrielle. Dans la méthode que nous proposons, les manipulations sont d'une grande simplicité et elles peuvent être exécutées en un temps très court, cinq minutes environ par dosage. En outre, cette méthode est aisément applicable à tous les toxiques minéraux dont il est possible de mesurer la fluorescence X ; seuls le beryllium, le bore et le fluor ne peuvent pas être dosés par ce procédé.

La sensibilité est suffisamment élevée pour qu'il soit possible de doser les éléments minéraux dans l'air à des taux qui sont inférieurs aux concentrations maximales tolérables dans l'atmosphère des locaux industriels, en opérant sur des prélèvements d'air inférieurs à 20 l.

La concentration relative de l'élément toxique par rapport à celle des autres poussières est pratiquement le seul facteur qui limite l'emploi de cette méthode. Si la proportion de l'élément toxique devient trop faible, les autres éléments présents dans les poussières recueillies, peuvent exercer des effets de matrice ou de tiers-élément qui faussent les mesures de fluorescence X.

3) La spectrométrie de fluorescence X présente également un réel intérêt quand il s'agit de doser dans l'air des toxiques gazeux qui peuvent être fixés par un réactif solide et qui renferment dans leur molécule un élément dont la fluorescence X est mesurable. Nous proposons une méthode pour le dosage dans l'air de l'hydrogène arsénié, gaz très toxique et difficile à doser avec précision par les méthodes d'analyse habituelles. Cette méthode repose sur la fixation d'hydrogène arsénié par un papier imprégné de chlorure mercurique, sur lequel on mesure ensuite la fluorescence X de l'arsenic. La méthode fournit des résultats dont la répétabilité est voisine de ± 7 p.100, pour des concentrations inférieures à 1 mg/m³. Avec un prélèvement d'air de 20 l, la limite de détection est dix fois plus faible que la concentration maximale tolérable admise aux Etats-Unis. Cette méthode peut donc servir à l'analyse de l'air dans les locaux de travail.

Elle doit même pouvoir être appliquée sans difficultés à d'autres gaz toxiques, tels que l'hydrogène sulfuré et l'hydrogène phosphoré.

4) Nous avons examiné avec une attention toute particulière la possibilité de doser des toxiques minéraux dans les milieux biologiques en mesurant directement leur fluorescence X sur les poudres qu'ils fournissent par dessiccation.

Nous avons montré que ce mode d'analyse permet le dosage d'au moins sept toxiques dans les viscères ou dans le sang aux taux où on les rencontre le plus souvent au cours des intoxications mortelles. La justesse et la reproductibilité des résultats paraissent satisfaisantes. Mais, pour la plupart des éléments toxiques, les sensibilités de la méthode d'analyse directe sont trop faibles pour que son emploi puisse être envisagé quand il s'agit de mettre en évidence des imprégnations toxiques à long terme.

Nous proposons une méthode utilisant des étalons externes pour le dosage des toxiques dont les taux dans les organes normaux sont négligeables, si on les compare aux seuils de détection de la méthode. Pour le dosage d'éléments tels que le zinc et le cuivre, dont les taux physiologiques sont supérieurs aux limites de détection, nous avons apporté à la méthode initiale des modifications qui permettent de l'appliquer à ces cas particuliers. Pour les éléments de cette catégorie, nous proposons aussi une micro-méthode par dilution de l'échantillon à analyser dans la poudre de cellulose pure.

Il est à signaler que nous n'avons pas pu appliquer ce mode d'analyse à l'urine qui fournit par évaporation un résidu pâteux impossible à transformer en pastille.

5) La suite de notre travail a été consacrée à l'étude de méthodes qui permettent de doser des éléments toxiques par spectrométrie de fluorescence X après les avoir séparés des milieux minéralisés.

Nous avons mis au point deux procédés. L'un repose sur l'isolement des toxiques à l'état de sulfures insolubles en milieu acide (arsenic, antimoine, argent, bismuth et mercure). En utilisant un filtre en papier de fibre de verre, nous avons pu isoler les précipités sans recourir à l'emploi d'un entraîneur, ce qui accroît la sensibilité des dosages dans une proportion importante. L'autre procédé s'adresse aux toxiques qui sont extractibles de leur solution aqueuse à l'état de dithizonates solubles dans le chloroforme ou le tétrachlorure de carbone, principalement le plomb, le thallium, le zinc et le mercure. Dans la technique que nous proposons, la solution chloroformique concentrée est évaporée sur de la poudre de cellulose, qui sert à confectionner une pastille sur laquelle on mesure la fluorescence X des éléments recherchés.

L'intérêt de ces procédés réside dans la possibilité d'isoler en bloc plusieurs éléments toxiques, la spécificité étant apportée par la méthode de mesure elle-même. Couplés avec des méthodes appropriées (minérali-

sation par le mélange sulfo-permanganique dans le cas de l'urine ou par combustion dans l'oxygène pur, en enceinte close dans le cas des tissus biologiques), ils permettent de déterminer, avec une bonne précision, des concentrations de toxiques minéraux de l'ordre de quelques ppm dans les viscères ou de quelques dizaines de microgrammes par litre d'urine. Cette sensibilité peut d'ailleurs être accrue en augmentant le volume de la prise d'essai soumise à l'analyse.

Dans ce travail, nous avons étudié quelques méthodes d'analyse par spectrométrie de fluorescence X dans le but d'appliquer cette méthode d'analyse relativement récente aux dosages des poisons dans les divers milieux où ils peuvent se rencontrer. Certes, bien d'autres méthodes basées sur le même principe peuvent être envisagées. Mais les quelques résultats que nous rapportons montrent que la spectrométrie de fluorescence X, du fait de la simplicité et de la rapidité qui précèdent les mesures, peut rendre de grands services au toxicologue, notamment dans le domaine de la Toxicologie professionnelle et de la Toxicologie médico-légale.

B I B L I O G R A P H I E

Ouvrages cités

- 1 BIRKS L.S.
X-Ray spectrochemical Analysis
Interscience - New York- 1959.
- 2 BOWEN H.J.N.
Trace elements in biochemistry
Academic Press -Londres et New York- 1966.
- 3 BUCHANAN W.D.
Toxicité des dérivés de l'arsenic
Elsevier publishing company - Londres-1962.
- 4 FABRE R.
Leçons de Toxicologie, Hermann et Cie, 1943.
- 5 FABRE R. et TRUHAUT R.
Précis de Toxicologie, (Société d'Edition d'Enseignement supérieur)- 1960.
- 6 GUINIER A.
Théorie et technique de la radiocristallographie
Dunod- 1964.
- 7 KOHN-ABREST E.
Précis de Toxicologie - Douin et Cie - 1955.

8 LUTZ

Cité par FABRE et TRUHAUT
Précis de Toxicologie, Sedes - 1961.

9 PRICK J.J.G., SILLERIS SMITH W.G. and MULLER L.

Empoisonnement par le thallium
Elsevier publishing company - Londres - 1955.

10 STEWART C.P. et STOLMAN A.

Toxicology - Academic Press - New York - 1960.

Publications originales

- 11 AGASSE E., GRIMBERG J.
Documentations des Const. Biol.
L'Expansion 1959.
- 12 ALEXANDER G.V.
Analyt. Chem. 1962, 34, 951.
- 13 ALEXANDER G.V.
Appl. Spectr., 1964, 18.
- 14 BARON G., FAVRE J. et RAIMBAULT C.
Revue de l'Institut français du pétrole
XIII, n°9, sept 1958, p.1253
XIV, n°4-5, avril-mai 1959, p.647.
- 15 BLANQUET P.
Règle à calcul pour spectrométrie de rayons X
Minerais et Métaux Paris.
- 16 BOQUIEN Y. et NICOLAS F.
Bull. Med. Leg. et toxi. med., 1964, n°5, 305.
- 17 BOYLEN G.W.Jr., HARDY H.L.
Amer. industr. Hyg. Ass., 1967, 28, n°2, 148-50.
- 18 BROOKS E.J., GATES O.R. et NOTTINGHAM M.
Amer. J. Clin. Pathol., 1964, 41, 154.
- 19 BUCHER W.H.
Bull. med. Leg. et Toxi. med., 1964, n°4, 231.

- 20 CAPELLE R.
Chim. Anal., 1960, 42, 127.
- 21 CHAMPION R.P., TAYLOR J.C. et WRITTEN R.N.
Anal. Chem. 1966, 38, 109.
- 22 CLAISSE F. et SAMSON Cl.
Rapport S-67
Ministère des richesses naturelles
Province du Québec, Canada, 1962.
- 23 CURRY
Charles C. Thomas, Publ. 1963.
- 24 DANES F.
Chim. anal., 1968, 50, 139.
- 25 DUDLEY H.C., MILLER J.W.
J. industr. Hyg. Toxicol., 1941, 23, 470.
- 26 GETTLER A. et WEISS L.
Amer. J. Clin. Pathol., 1943, 13, 422.
- 27 GLOVER J.R.
Ann. occup. Hyg. G.B., 1967, 10, n°1, 3.
- 28 GOLDMAN M., ANDERSON R.P., HENRY J.P. et PEOPLES S.A.
J. agric. Food Chem. U.S.A., 1966, 14, 367.
- 29 GOLDWATER L.J.
Chronique de l'OMS, 1965, 21, 212.
- 30 GUTENMANN W.H. et LISK D.J.
Agricul. and Food Chemis., 1960, 8, 306.

- 31 GUTENMANN W.H., SAINT JOHN L.E., BARRY K.L., JONES E.D. and LISK D.J.
Agricul. and Food Chemis., 1961, 9, 50.
- 32 HALL T.
Science, 1961, 134, 449.
- 33 HAUCK G.
Deutsch. Zeitsc. für gesante gerich., 1964, 55, 140.
- 34 HERTROYS P. et DE VRIES J.L.
Communication aux Conférences sur la spectrométrie de rayons X
à Lunteren et Swansea en 1965.
- 35 HOLMQUIST I.
XVè congr. internation. Med. Trav. Vienne, 1966, 1.
- 36 HOWIE R.A., SMITH H.
Forens. Sci. Soc. J., G.B., 1967, 7, 2, 90.
- 37 JACKWERTH E. et KLOPPENBURG H.G.
Naturwissench., 1960, 47, 444.
- 38 KAWASHIRO I. et TANABE H.
Bull. nation. Inst. Hyg. Sci. Jap., 1960, 78.
- 39 KEENAN R.G.
Rev. Hyg. prof. Canada, 1966, 18, n°1, 3.
- 40 MARCIE J.F.
Environment Sci. Techn., U.S.A., 1967, 1, 164.
- 41 MOLOKHIA M. et SMITH H.
Arch. environment Health, U.S.A., 1967, 15, 6, 745.

- 42 NATELSON S. et BENDER S.L.
Microchem. J., 1959, 3, 19.
- 43 NATELSON S., RICHELSON M., SHEID B. et BENDER S.L.
Clin. Chem., 1959, 5, 519.
- 44 NATELSON S. et SHEID B.
Clin. Chem., 1960, 6, 299.
- 45 NATELSON S. et SHEID B.
Clin. Chem., 1961, 7, 115.
- 46 NATELSON S. et SHEID B.
Analyt. Chem., 1961, 33, 396.
- 47 NOIRFALISE A.
Bull. Med. Leg. et Toxi. med., 1965, 3-4, 290.
- 48 NORME française
NF X 05-0 20 - "Termes employés dans l'estimation et le contrôle
de la qualité".
- 49 PAULUS W.
Arch. f. exp. Pathol. und Pharmacol., 1947, 204, 186.
- 50 REED J.F. et CUMMINGS R.W.
Cité dans Polarographie, 1952, 2, 508
KOLTHOFF I.M. et LINGANE J.J.
Interscience Publishers - New York.
- 51 REHLING C.J.
Progr. chem. Toxicol. 1967, 3, 363.

- 52 ROCH M.J. et coll.
Cancer 1956, 9.
- 53 SENTENAC - ROUMANOU H.
Thèse de doctorat d'Université (Pharmacie)
Bordeaux, 1964.
- 54 SHAFER R.
Inaug. Diss. Dokt. Med. Basel, 1965.
- 55 STERNER J. H. and LIDFELT V.
J. Pharmac. Exp. Thér., 1941, 73, 205.
- 56 TER MEULEN
Nature, London, 1932, 130.
- 57 TER MEULEN
Revue tra. chim. P.B. 1932.
- 58 VIGNOLI L. et DEFRETIN J.P.
Biol. med., Fr. 1963, 52, n°3, 319.
- 59 WENGER P.E., KAPETANIDIS I. et VON JANSTEIN W.
Pharm. Acta Helv., 1962, 37, 472.
- 60 WILLIAMS K.T., LAKIN H.W. and BYERS H.G.
Tech. Bull., 1941, 758, 1.
- 61 XVIIIè Congrès des Hygiénistes industriels gouvernementaux des U.S.A.
1966.

TABLE DES MATIERES

PREMIERE PARTIE

GENERALITES

	Page
I - L'analyse par spectrométrie de fluorescence X	1
1 - Principe	1
2 - Appareillage	4
II - Applications de l'analyse par spectrométrie de fluorescence X en Biologie et en Toxicologie	7

DEUXIEME PARTIE

BASES THEORIQUES DES RECHERCHES PERSONNELLES

I - Effet de matrice et de tiers-élément en fluorescence X	10
II - Problèmes posés par l'application de la spectrométrie de fluorescence X à l'analyse toxicologique	13

	Page
III - Modes de comptage	16
IV - Modes de calcul des concentrations recherchées	19
V - Critères d'évaluation de la qualité des méthodes proposées	23
1 - Sensibilité et limite de détection	24
2 - Justesse	27
3 - Fidélité	28
VI - Matériel et conditions de mesures	29
1 - Spectrodiffractomètre	29
2 - Conditions de mesures	30

TROISIEME PARTIE

A P P L I C A T I O N D E L A S P E C T R O M E T R I E D E F L U O R E S C E N C E X A L ' I D E N T I F I C A T I O N E T A U D O S A G E D E S E L E M E N T S T O X I Q U E S D A N S L ' A T M O S P H E R E ---

I - Poussières atmosphériques	31
1 - Principe	32
2 - Matériel	32

A - Porte-filtre	
B - Dispositif de prélèvement	
3 - Mode opératoire	33
A - Prélèvement des poussières	
B - Mesure de la fluorescence X	
4 - Préparation de la gamme de référence	34
5 - Discussion de la méthode	35
A - Prélèvement des poussières	
B - Mesure de la fluorescence X	
C - Evaluation de la qualité de la méthode	
a - Sensibilité et limite de détection	
b - Justesse	
II - Gaz toxiques	39
1 - Principe	40
2 - Matériel	41
A - Porte-filtre	
B - Filtres	
C - Dispositif de prélèvement	
3 - Mode opératoire	41

	Page
4 - Préparation de la gamme de référence	41
5 - Discussion de la méthode	42
A - Prélèvement des échantillons	
B - Mesure de la fluorescence X	
C - Evaluation de la qualité de la méthode	
a - Répétabilité	
b - Sensibilité et limite de détection	
c - Spécificité	

QUATRIEME PARTIE

APPLICATION DE LA SPECTROMETRIE DE FLUORESCENCE X A L'IDENTIFICATION ET AU DOSAGE DES TOXIQUES MINERAUX DANS LES MILIEUX BIOLOGIQUES

I - Analyse directe des milieux Biologiques desséchés	46
1 - Toxiques minéraux dont les taux normaux dans les tissus sont inférieurs aux seuils de détection de la méthode d'analyse	47

A - Méthode avec étalons externes

- a - Principe
- b - Mode opératoire
- c - Préparation de la gamme de référence
- d - Discussion de la méthode
 - Influence du poids de la pastille
 - Influence du taux de compression de la pastille
 - Influence du tamisage de la poudre
 - Homogénéité de la composition des pastilles
 - Mode d'expression de la fluorescence X des éléments recherchés
 - Evaluation de la qualité de la méthode
- Sensibilité et limite de détection
- Justesse et répétabilité

B - Méthode des surcharges

2 - Toxiques minéraux dont les taux normaux sont supérieurs aux seuils de détection de la méthode d'analyse 56

A - Méthode de dosage du zinc et du cuivre dans la poudre

- a - Principe
- b - Mode opératoire
- c - Préparation de la gamme de référence
- d - Discussion de la méthode
 - Influence de la composition de la matrice sur les effets de tiers-élément
 - Evaluation de la qualité de la méthode

B - Microméthode de dosage du zinc par dilution dans une poudre inerte

- a - Principe
- b - Mode opératoire
- c - Préparation de la gamme de référence
- d - Discussion de la méthode
 - Etude de l'effet de matrice
 - Evaluation de la justesse et de la répétabilité de la méthode

C - Comparaison de la méthode directe et de la microméthode

II - Analyse des milieux biologiques après minéralisation et enrichissement

65

1 - Enrichissement par précipitation à l'état de sulfures insolubles

66

- A - Principe
- B - Matériel
- C - Mode opératoire
- D - Préparation de la gamme de référence
- E - Discussion de la méthode
 - a - Choix du filtre
 - b - Influence de la présence du cuivre sur la fluorescence X des précipités de sulfures
 - c - Sensibilités et limites de détection

	Page
2 - Enrichissement par extraction des toxiques à l'état de dithizonates	71
A - Principe	
B - Matériel	
a - Moule pour la préparation des pastilles de taille réduite	
b - Dispositif d'évaporation	
C - Mode opératoire	
D - Préparation de la gamme de référence	
E - Discussion de la méthode	
a - Choix du support des dithizonates	
b - Contrôle de l'homogénéité des pastilles de cellulose et de dithizonates	
c - Sensibilités et limites de détection	
3 - Choix des méthodes de minéralisation	76
A - Minéralisation de l'urine	
B - Minéralisation des milieux biologiques	
4 - Evaluation de la justesse et de la répétabilité des analyses après minéralisation et enrichissement	79
III - Limites d'utilisation de l'analyse par spectrométrie de fluorescence X pour le dosage des éléments toxiques dans les milieux biologiques	80
IV - Conclusions	83
- Bibliographie -	87

Vu, le Président de Thèse,

Vu, le Doyen de la Faculté,

Vu et permis d'imprimer,
Le Recteur de l'Académie.

